

ref. 6

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-46066

(P2001-46066A)

(43)公開日 平成13年2月20日(2001.2.20)

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマート(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4B024
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D 4B064
			N 4B065
A 6 1 P 9/00		A 6 1 P 9/00	4C085
17/06		17/06	4H045
審査請求 未請求 請求項の数40	O L	(全64頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-220545

(22)出願日 平成11年8月3日(1999.8.3)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社  
東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 設楽 研也

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵  
工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 佐藤 秀尚

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵  
工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 中村 和靖

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵  
工業株式会社東京研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規な相補性決定領域を有するヒトVEGF受容体KDRに対する抗体

(57)【要約】

【課題】 固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患を診断、治療するための、抗ヒトVEGF受容体KDR抗体の開発が望まれている。

【解決手段】 本発明は、ヒトVEGF受容体KDR に反応し、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体に関する。ヒトVEGF受容体KDRに結合し、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDR への結合を阻害してKDRの作用を中和する抗体に関する。さらに、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断および治療方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号5、6および7、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含み、ヒトVEGF受容体KDRに反応するが、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体。

【請求項2】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域に特異的に反応する抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項3】 抗体が、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDRへの結合を阻害し、かつKDRの作用を中和する抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項4】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～518番目の領域にあるエピトープを認識する抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項5】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～104、1～194、105～393、295～393および394～518番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識する抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】 抗体がヒト化抗体、ヒト抗体およびこれらの抗体断片である請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項7】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である請求項6記載のヒト化抗体。

【請求項8】 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項9】 抗体のL鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項10】 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む請求項7記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項11】 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む請求項7記載のヒト型キメラ抗体KM2992。

【請求項12】 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項6記載の抗体断片。

【請求項13】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、dsFvおよびCDRを含むペプチドから選ばれる請求項12記載の抗体断片。

【請求項14】 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCD

R3がそれぞれ配列番号11、12および13、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列を含み、ヒトVEGF受容体KDRに反応するが、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体。

【請求項15】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域に特異的に反応する抗体である、請求項14記載の抗体。

【請求項16】 抗体が、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDRへの結合を阻害し、かつKDRの作用を中和する抗体である、請求項14記載の抗体。

【請求項17】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～518番目の領域にあるエピトープを認識する抗体である、請求項14～16のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項18】 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～104、1～194、105～393、295～393および394～518番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識する抗体である、請求項14～16のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項19】 抗体がヒト化抗体、ヒト抗体およびこれらの抗体断片である請求項14～18のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項20】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である請求項19記載の抗体。

【請求項21】 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含む、請求項20記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項22】 抗体のL鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む、請求項20記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項23】 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む請求項20記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項24】 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む請求項20記載のヒト型キメラ抗体KM2995。

【請求項25】 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項19記載の抗体断片。

【請求項26】 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、dsFvおよびCDRを含むペプチドから選ばれる請求項25記載の抗体断片。

【請求項27】 請求項1～26のいずれか1項に記載の抗体またはこれらの抗体断片と、放射性同位元素、蛋

白質、低分子の薬剤とを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体またはこれらの抗体断片の誘導体。

【請求項28】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体、抗体断片、またはこれらの誘導体をコードするDNA。

【請求項29】 請求項28記載のDNAとベクターとを含有する組換えベクター。

【請求項30】 請求項29記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項31】 請求項30記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1～27記載の抗体または抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする抗体または抗体断片の製造方法。

【請求項32】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出する方法。

【請求項33】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に定量する方法。

【請求項34】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

【請求項35】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する方法。

【請求項36】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRとの結合を阻害する方法。

【請求項37】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを中和する方法。

【請求項38】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いる、血管新生異常疾患の診断方法。

【請求項39】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬。

【請求項40】 請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分とする、血管新生異常疾患の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用な、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に結合する抗体、該抗体をコードするDNA、該抗体を生産する細胞株、該抗体を用いたヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出する方法、ヒトV

EGFとヒトVEGF受容体KDRとの結合を阻害する方法、ヒトVEGF受容体KDRを中和する方法ならびに該抗体を用いる血管新生異常疾患の診断方法、診断薬および治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している[J. Biol. Chem., 267, 10931(1992)]。血管新生は、血管新生因子が分泌されることが引き金となり、近傍にある既存の血管の内皮細胞からプロテアーゼが分泌され、基底膜、間質が破壊され、続いて血管内皮細胞の遊走、増殖がはじまり、管腔が形成されることで血管が新生される過程よりなる[J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている[Advances in Cancer Research 67, 281 (1995)]。VPF/VEGFはホモダイマーよりなる分子量約4万のタンパクであり、1983年に血管透過性促進因子(Vascular permeability factor: VPF)として[Science 219, 983 (1983)]、1989年に血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)として独立した分子として報告されたが[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、cDNAクローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった[Science, 246, 1306 (1989); Science, 246, 1309 (1989)] (以下VEGFと記載)。VEGFの活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対し、増殖促進活性(ED50 = 2-3 pM)[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、遊走促進活性[J. Immunology, 152, 4149 (1994)]、メタプロテアーゼ分泌促進活性[J. Cell Physiol., 153, 557 (1992)]、ウロキナーゼ、tPA分泌促進活性[Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902(1991)]を示し、in vivoにおいては血管新生促進活性[Circulation, 92 suppl III, 365 (1995)]、血管透過性促進活性[Science, 219, 983 (1983)]が報告されている。VEGFは血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であることが報告されている[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]。VEGFにはAlternative splicingにより4種類のタンパクが存在することが報告されている[J. Biol. Chem., 267, 26031 (1992)]。

【0003】 血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチの病態形成にVEGFが深く関与していることが報告されてい

る。固形腫瘍については、これまでに腎癌[Cancer Research, 54, 4233 (1994)]、乳癌[Human Pathology, 26, 86 (1995)]、脳腫瘍[J. Clinical Investigation, 91, 153 (1993)]、消化器癌[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]、卵巣癌[Cancer Research, 54, 276 (1994)]などの多くのヒト腫瘍組織においてVEGFが産生されていることが報告されている。乳癌についてはVEGFと患者の予後との関係が検討された結果、VEGF高発現腫瘍は、低発現腫瘍に比べ、腫瘍血管新生が盛んであり生存率が低いことが明らかとなっている[Japanese J. Cancer Research, 85, 1045 (1994)]。また、ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗VEGFモノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている[Nature, 362, 841 (1993)]。さらに、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗VEGFモノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている[Cancer Research, 56, 921 (1996)]。従って、VEGF活性を抑制することができれば癌患者における腫瘍の増殖、転移形成を抑制できるものと期待される。また、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度のVEGFが検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示され[Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211 (1994)]、VEGFをブロックすることで癌性胸水、腹水の貯留を防ぐことも期待される。

【0004】糖尿病網膜症においては、異常な血管新生により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内のVEGFレベルが正相関することが報告されている[New England J. Medicine, 331, 1480 (1994)]。また、サル網膜症モデルにおいて抗VEGF中和モノクローナル抗体の眼内投与によりVEGF活性を抑制すると血管新生が抑制されることが報告されている[Arch Ophthalmol., 114, 66 (1996)]。従って、過剰に産生されるVEGF活性を抑制することで糖尿病性網膜症における血管新生を抑制できることが期待される。

【0005】慢性関節リウマチの関節炎の病態の進展(骨、軟骨の破壊)には血管新生を伴うが、慢性関節リウマチ患者の関節液中にはVEGFが高濃度で含まれること、関節中のマクロファージがVEGFを産生することが報告されている[Journal of Immunology, 152, 4149 (1994); J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。過剰に産生されるVEGF活性を抑制することで関節炎における血管新生を抑制できることが期待される。

【0006】ヒトのVEGF受容体としては、これまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する受容体であるFlt-1(fms-like tyrosine kinase)[Oncogene, 5, 519 (1990); Science, 255, 989 (1992)]およびKDR(kinase insert domain-containing receptor) [W092/14748; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579 (1992)]が報告されている。ヒト型VEGF受容体KDRのマウス型ホモロ

グはFlk-1[Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026 (1991); W094/11499; Cell, 72, 835 (1993)]と命名されている。Flt-1およびKDR/Flk-1の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインはチロシンキナーゼドメインを有する分子量180~200キロダルトンの膜タンパクよりなる。VEGFは、Flt-1およびKDR/Flk-1に対して、それぞれKD値が20 pMおよび75 pMで特異的に結合する。Flt-1およびKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。ヒト型受容体KDRとマウス型受容体Flk-1のアミノ酸配列のホモロジーは、細胞内のN末端側のチロシンキナーゼドメインおよびC末端側のチロシンキナーゼドメインは、それぞれ95%および97%と非常に高いが、細胞外ドメイン間のホモロジーは80%と少し低い[J. Cellular Biochemistry, 54, 56 (1994)]。

【0007】様々なヒトの疾患におけるKDRの発現については、ヒト脳腫瘍組織の腫瘍血管内皮細胞[American J. Pathology, 146, 368 (1995)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞[Cancer Research, 53, 4727, (1993)]においては正常組織の血管内皮細胞に比べKDRの mRNAレベルの発現が上昇していることが報告されている。これらの結果は、腫瘍血管新生においてVEGF-VEGFレセプターKDR系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、慢性関節リウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもin situ hybridizationによりKDR mRNAの発現が認められることが報告されており[J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]、VEGF-VEGFレセプターKDR系の重要性を示唆している。

【0008】VEGFレセプターKDR/Flk-1の機能については、ブタ動脈の血管内皮細胞にKDRを発現させるとVEGFに反応し増殖、遊走することから、VEGFの多様な活性の中でKDRは血管内皮細胞の増殖、遊走に関与すると報告されている[J. Biol. Chem., 269, 26988 (1994)]。また、マウス型flk-1遺伝子を破壊したflk-1ノックアウトマウスは成熟した血管内皮細胞が全く認められず、卵黄囊の血島も形成されず、子宮内で死亡したことから、動物個体においてもKDR/flk-1は血管内皮細胞の増殖、分化に関与することが報告されている[Nature, 376, 62 (1995)]。

【0009】Flk-1の細胞内チロシンキナーゼドメインを除去した不活性型のFlk-1ミュータントを用い、ウイルスベクターにより内皮細胞に導入する方法を試みたところ、不活性型Flk-1ミュータントウイルスと腫瘍細胞を混合して動物細胞に移植すると腫瘍の増殖が抑制されることが報告されており[Nature, 367, 576 (1994)]、Flk-1のシグナル伝達を阻害することで腫瘍増殖が抑制されることが示されている。

【0010】マウス型Flk-1細胞外ドメインに対するモ



ノクローナル抗体については、ラットモノクローナル抗体が報告されている。マウス型Flk-1の細胞外ドメインとFLAG<sup>TM</sup>融合タンパクを免疫原に用いて、ラットよりハイブリドーマを作製し、取得した3種のラットモノクローナル抗体4H3, 3B6, 3C8は細胞上に発現したマウスFlk-1を免疫沈降できると報告されているが、VEGFの機能阻害活性については解析されていない (WO 95/21865)。また、マウス型Flk-1の細胞外ドメインとSEAPs (Secretory alkaline phosphatase) 融合タンパクを免疫原に用いてラットにおいて作製したモノクローナル抗体DC101は、細胞表面のマウスFlk-1/fmsキメラレセプター (細胞外ドメインがFlk-1であり、細胞内ドメインがfmsであるキメラ分子) に反応することが報告されている。DC101は、VEGF刺激によるマウスFlk-1/fmsキメラレセプターのfmsチロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害する活性を有する。しかしながら、Flk-1チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害する活性については示されていない。ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、DC101は抗腫瘍効果を示すことが報告されている (WO 95/21868)。DC101はマウス型Flk-1に反応するが、ヒト型KDRには反応しない。

【0011】文献[Hybridoma, 16, 465 (1997)]には、ヒトKDRのイムノグロブリン様ドメインの6、7番目に特異的に反応する2種のマウスモノクローナル抗体2-7-9および2-10-1が報告されているが、ヒトVEGF受容体KDRのイムノグロブリン様ドメインの1～5番目に特異的に反応する抗体、あるいはヒト型VEGF受容体KDRに結合し、かつKDRの作用を中和する抗体は知られていない。

【0012】以上のことから、ヒトVEGF受容体Flt-1には結合せず、ヒトVEGF受容体KDRに結合し、かつKDRの作用を中和する抗体はヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断、治療に有用であることが期待される。しかしながら、ヒトVEGF受容体KDRを発現している細胞を検出でき、かつ、VEGFの作用を中和する抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体はこれまで確立されていない。先に述べたとおり、抗マウス型Flk-1に対するモノクローナル抗体を作製できることは報告されているが、ヒトの場合に有用である、リガンドであるVEGFの結合を阻害する抗ヒト型VEGF受容体KDR抗体を作製することはこれまでに知られていない。

【0013】一般にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることによりヒト体内にヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体ができる。その結果、投与されたヒト以外の動物抗体と反応し、副作用を引き起こしたり [J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984); Blood, 65, 1349 (1985); J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1242 (1985)]、抗体

がはやくクリアランスされたり [J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985); Blood, 65, 1349 (1985); J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988)]、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている [J. Immunol., 135, 1530 (1985); Cancer Res., 46, 6489 (1986)]。

【0014】これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR (complementary determining region; 以下、CDRと略記する場合もある) 移植抗体 (再形成ヒト抗体) のようなヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体は、抗体可変領域 (以下、V領域と称す) がヒト以外の動物抗体由来で抗体定常領域 (以下、C領域と称す) がヒト抗体由来である抗体であり [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 (1984)]、ヒトに投与した場合、ヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体はほとんど惹起されず、血中半減期が6倍のびることが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220 (1989)]。ヒト型CDR移植抗体はヒト抗体のCDRをヒト以外の動物由来の抗体のCDRと置換した抗体であり [Nature, 321, 522 (1986)]、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4～5倍伸びることが報告されている [J. Immunol., 147, 1352 (1991)]。

【0015】従って、ヒトVEGF受容体KDRに対して特異的に結合するヒト化抗体は、ヒト体内に投与したときにヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に対する抗体が生じないことによる、副作用の減少、および血中半減期の延長により、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患等に対する高い治療効果が期待される。

【0016】さらに、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、一本鎖抗体 [Science, 242, 423 (1988)] あるいはジスルフィド安定化抗体 [Molecular Immunology, 32, 249 (1995)] といった、より小さな抗体分子の作製が行われている。一本鎖抗体やジスルフィド安定化抗体はモノクローナル抗体あるいはヒト化抗体に比べ、その分子量が小さいことから組織移行性、血中からのクリアランスに優れ、イメージング等への応用、さらにはトキシンとの複合体の作製も行われ、治療効果も期待されている [Cancer Research, 55, 318 (1995)]。従って、ヒトVEGF受容体KDR特異的に結合する一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患等に対する高い診断、治療効果が期待される。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】固形腫瘍の増殖もしくは

は転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症あるいは乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患を診断、治療するための有用な方法が求められている。抗ヒトVEGF受容体KDR抗体は、血管新生部位を検出および抑制することができ、上記のような異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療および診断に役立つと期待される。

#### 【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患を診断、治療するために有用なヒト型VEGF受容体KDRに結合し、かつKDRの作用を中和する抗体の開発に関して鋭意検討し、本発明を完成するに至った。

【0019】すなわち、本発明は、以下の(1)～(40)に関するものである。

(1) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号5、6および7、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含み、ヒトVEGF受容体KDRに反応するが、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体。

(2) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域に特異的に反応する抗体である、上記(1)記載の抗体。

(3) 抗体が、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDRへの結合を阻害し、かつKDRの作用を中和する抗体である、上記(1)記載の抗体。

(4) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～518番目の領域にあるエピトープを認識する抗体である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体。

【0020】(5) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～104、1～194、105～393、295～393および394～518番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識する抗体である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体。

(6) 抗体がヒト化抗体、ヒト抗体およびこれらの抗体断片である上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の抗体。

(7) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である上記(6)記載のヒト化抗体。

(8) 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含む、上記(7)記載のヒト型キメラ抗体。

【0021】(9) 抗体のL鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む、上記(7)記載のヒト型キメラ抗体。

(10) 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む上記(7)記載のヒト型キメラ

抗体。

(11) 抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む上記(7)記載のヒト型キメラ抗体KM2992。

(12) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記(6)記載の抗体断片。

【0022】(13) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、dsFvおよびCDRを含むペプチドから選ばれる上記(12)記載の抗体断片。

(14) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号11、12および13、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列を含み、ヒトVEGF受容体KDRに反応するが、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体。

(15) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域に特異的に反応する抗体である、上記(14)記載の抗体。

(16) 抗体が、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDRへの結合を阻害し、かつKDRの作用を中和する抗体である、上記(14)記載の抗体。

【0023】(17) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～518番目の領域にあるエピトープを認識する抗体である、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載の抗体。

(18) 抗体が、ヒトVEGF受容体KDRの、配列番号55に記載されたアミノ酸配列1～104、1～194、105～393、295～393および394～518番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識する抗体である、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載の抗体。

(19) 抗体がヒト化抗体、ヒト抗体およびこれらの抗体断片である上記(14)～(18)のいずれか1項に記載の抗体。

(20) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である上記(19)記載の抗体。

【0024】(21) 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含む、上記(20)記載のヒト型キメラ抗体。

(22) 抗体のL鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む、上記(20)記載のヒト型キメラ抗体。

(23) 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む上記(20)記載のヒト型キメラ抗体。

(24) 抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む上記(20)記載のヒト型キメラ抗体KM2995。

【0025】(25) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記(19)記載の抗体断片。

(26) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含む、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、dsFvおよびCDRを含むペプチドから選ばれる上記(25)記載の抗体断片。

(27) 上記(1)～(26)のいずれか1項に記載の抗体またはこれらの抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤とを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体またはこれらの抗体断片の誘導体。

(28) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体、抗体断片、またはこれらの誘導体をコードするDNA。

【0026】(29) 上記(28)記載のDNAとベクターとを含有する組換えベクター。

(30) 上記(29)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(31) 上記(30)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(27)記載の抗体または抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする抗体または抗体断片の製造方法。

(32) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出する方法。

【0027】(33) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に定量する方法。

(34) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(35) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する方法。

(36) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRとの結合を阻害する方法。

(37) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いてヒトVEGF受容体KDRを中和する方法。

【0028】(38) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を用いる、血管新生異常疾患の診断方法。

(39) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬。

(40) 上記(1)～(27)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分とする、血管新生異常疾患の治療薬。

【0029】

【発明の実施の形態】ヒトVEGF受容体KDRの細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなる。ヒトVEGF受容体KDRの細胞外ドメインのN末端側から1番から7番までのイムノグロブリン様ドメインの模式図および該ドメインのアミノ酸配列におけるアミノ酸番号を第19図に示した。本発明は、ヒトVEGF受容体KDRに反応するが、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しない抗体、ヒトVEGF受容体KDRの1～5番目のイムノグロブリン様ドメインに特異的に反応する抗体を提供する。

【0030】本発明における抗体は、抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号5、6および7、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列、または、抗体の重鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号11、12および13、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列を含み、かつヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応すればいかなるものでもよいが、以下に述べるヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片などが好適なものとしてあげられる。

【0031】ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR(Complementary Determining Region;相補性決定領域 以下、CDRと記す)移植抗体などがあげられる。ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域(以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す)および抗体軽鎖可変領域(以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す)とヒト抗体の重鎖定常領域(以下、定常領域はC領域としてCHとも称す)およびヒト抗体の軽鎖定常領域(以下、CLとも称す)とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0032】本発明のヒト型キメラ抗体は、ヒトVEGF受容体KDRに結合し、KDRの作用を中和するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、hIgと表記する)に属すればいかなる

ものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

【0033】ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。本発明のヒト型CDR移植抗体は、ヒトVEGF受容体KDRに反応し、ヒトVEGF受容体KDRに結合し、KDRの作用を中和する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

【0034】ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

【0035】ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不活化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、完全型ヒト抗体へも変換することができる。

【0036】ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動

物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0037】Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パバインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFabは、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パバインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

【0038】F(ab')<sub>2</sub>は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のF(ab')<sub>2</sub>は、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、該抗体のF(ab')<sub>2</sub>をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、F(ab')<sub>2</sub>を製造することができる。

【0039】Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFab'は、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

【0040】一本鎖抗体(以下、scFvとも称す)は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー(以下、Pと称す)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明のヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。本発明の一本鎖抗体は、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、一本鎖抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、一本鎖抗体を製造することができる。

【0041】ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsF vとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用されるジスルフィド安定化V領域断片に含まれるVHおよびVLは本発明のヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

【0042】本発明のジスルフィド安定化V領域断片は、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ジスルフィド安定化V領域断片をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、ジスルフィド安定化V領域断片を製造することができる。CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

【0043】本発明のCDRを含むペプチドは、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、CDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

【0044】融合抗体は、本発明のヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体をいう。本発明の融合抗体は、ヒトVEGF受容体KDRに特異的に反応する抗体および抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、該抗体および抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには該抗体および抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させることにより製造することができる。

【0045】放射性同位元素としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体または抗体断片に結合させることができる。低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、

ドキシソルビシンなどの抗生物質、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤[臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）]、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の炎症剤[炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社]などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

【0046】蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン12等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

【0047】本発明の抗体は、ヒトVEGF受容体KDRに結合し、ヒトVEGFのヒトVEGF受容体KDRへの結合を阻害し、KDRの作用を中和するため、ヒトVEGFが有する血管内皮細胞に対する増殖促進活性、遊走促進活性、マトロプロテアーゼ分泌促進活性、ウロキナーゼ、tPA分泌促進活性、in vivo血管新生促進活性、血管透過性亢進活性等を阻害することができる。したがって、本発明は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断および治療に利用することができる。以下に、本発明の抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト化抗体、抗ヒトVEGF受容体KDR一本鎖抗体および抗ヒトVEGF受容体KDRジスルフィド安定化抗体の製造法、ならびに該抗体によるヒトVEGF受容体KDRの検出および定量法について説明する。

【0048】1. 抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の作製方法

(1) 抗原の調製

50 抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体を作製するた



めに必要な抗原としては、ヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体KDR蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などがあげられる。ヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-KDR細胞〔セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213 (1996)〕があげられる。長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体KDR蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質として発現させる方法としては、ヒトVEGF受容体KDRをコードする全長あるいはその部分断片cDNA〔セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213 (1996)〕を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒトVEGF受容体KDR発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

【0049】宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サル細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマンジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

【0050】本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

【0051】細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オ

ブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 69, 2110-2114 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、YCp 50 (ATCC37419) 等が用いられる。

【0052】酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法〔メソッス・オブ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182-187 (1990)〕、スフェロプラスト法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 1929-1933 (1978)〕、酢酸リチウム法〔ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 153, 163-168 (1983)〕等、いずれの方法も用いられる。動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE 107 [特開平3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE 103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) 101, 1307 (1987)] 等が用いられる。

【0053】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)〕等、いずれの方法も用いられる。

【0054】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1~34 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-34)、バキュロウィルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus expression vectors A laboratory manual) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウィルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

【0055】遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジ

10

20

30

40

50



エン社製)等が用いられる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)などが用いられる。組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)]等が用いられる。

【0056】また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる[Bio/Technology (Bio/Technology), 9, 47(1988)]。遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボ・プレス[MolecularCloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下、「モレキュラー・クローニング 第2版」と記す]に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0057】以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0058】大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含む、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい(モレキュラー・クローニング 第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下、15~40℃で16~96時間行う。培養期間中、pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0059】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35~37℃で3~7日間行い、培

養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0060】昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地[ファーマンジェン(Pharmingen)社製]、Sf9001 ISFM[ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社製]、ExCell400、ExCell405[いずれもJRHバイオサイエンス(JRH Biosciences)社製]等が用いられる。培養は、25~30℃で1~4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0061】上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

【0062】さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

【0063】ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせで行うことができる。

【0064】(2)動物の免疫と抗体産生細胞の調製  
上記で得られた該蛋白質を抗原として免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を結合させて投与したり、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

【0065】キャリアタンパク質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒ

ト哺乳動物があげられる。

【0066】抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 $\mu$ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)〕などで確認する。そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

【0067】抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法〔アンティボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー(Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下、アンチボディー・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す〕に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

#### 【0068】(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)〔G.Kohlerら；ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Europ. J. Immunol.), 6, 511(1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔M.Shulmanら；ネイチャー(Nature), 276, 269(1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J.F.Kearneyら；ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 123, 1548(1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔G.Kohlerら；ネイチャー(Nature), 256, 495(1975)〕など、イン・ビトロ(in vitro)で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法(アンチボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時まで2 $\times 10^7$ 個以上の細胞数を確保する。

#### 【0069】(4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT培地〔正常培地〔RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール(5 $\times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン(10 $\mu$ g/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地〕にヒポキサンチン(10 $^{-4}$ M)、チミジン(1.5 $\times 10^{-5}$ M)およびアミノプテリン(4 $\times 10^{-7}$ M)を加えた培地〕を用いる。培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希

釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 【0070】酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体に、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したものである。具体的には、ハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。上記ハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株KM1668(FERM BP-6216)、KM1992(FERM BP-6217)、およびKM1995(FERM BP-6218)が挙げられる。

#### 【0071】(5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

【0072】モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

【0073】抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられるが、特にマウスIgG1、IgG2a、ヒトIgG1タイプは、補体依存性細胞傷害活性(以下、CDC活性)および抗体依存性細胞傷害活性(以下、ADCC活性)を有し、治療への応用上、有用である。

#### 【0074】2. 抗ヒトVEGF受容体KDRヒト化抗体の作製

##### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために

必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。ヒト抗体のC領域としては、例えば、ヒト抗体H鎖ではC $\gamma$ 1やC $\gamma$ 4、ヒト抗体L鎖ではC $\kappa$ 等の任意のヒト抗体のC領域を用いることができる。ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、PAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、PAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

【0075】ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

【0076】(2) ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒトVEGF受容体KDR モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得する。抗ヒトVEGF受容体KDR モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスヒトVEGF受容体KDR 抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライ

ブリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0077】該VHおよびVLをコードする塩基配列としては、それぞれ配列番号1あるいは配列番号3および配列番号2あるいは配列番号4で示される塩基配列があげられる。配列番号1で示されるDNAを含む組み換えプラスミドpBS1992Hを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pBS1992H、配列番号2で示されるDNAを含む組み換えプラスミドpBS1992Lを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pBS1992L、配列番号3で示されるDNAを含む組み換えプラスミドpBS1995Hを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pBS1995H、配列番号4で示されるDNAを含む組み換えプラスミドpBS1995Lを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pBS1995Lは、工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、FERM BP-6803、FERM BP-6804、FERM BP-6805、FERM BP-6806として寄託されている。

【0078】(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の5'上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の5'上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

【0079】(4) ヒト以外の動物の抗体のCDR 配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的に保存された4個のフレームワーク領域(以下、FR領域と称す)とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域(CDR)から成っている [シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]。そして各CDR アミノ酸配列(CDR 配列)は、既知

の抗体のV 領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより同定することができる。H鎖V領域のCD R1、CDR2およびCDR3の具体例としては、配列番号5、6 および7、または配列番号11、12および13などがあげられる。L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3の具体例としては、配列番号8、9および10、または配列番号14、15および16などがあげられる。

【0080】(5) ヒト型CDR 移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDR を移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV 領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR 移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相溶性、好ましくは65%以上の相溶性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA 配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDR のアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA 配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA配列を得るためには、全DNA配列をカバーするように各鎖について数本の合成DNAを設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと記す) を行う。PCR での反応効率および合成可能なDNA の長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成DNA を設計する。反応後、増幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型CDR 移植抗体の各鎖のV 領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを取得する。また、約100塩基よりなる合成DNAを用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型CDR 移植抗体の各鎖のV 領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを構築することもできる。

【0081】(6) ヒト型CDR 移植抗体のV 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR 移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のV 領域のCDR のみをヒト抗体のV 領域のFR間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている。

[バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体のV 領域のFRのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピュータモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

【0082】選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2 (5)に記載のPCR を行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター (以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す) を取得する。

【0083】また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA 配列を含む20~35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

【0084】(7) ヒト型CDR 移植抗体発現ベクターの構築

前記2 (1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子の upstream に、前記2 (5)および2 (6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'末端および3'末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子の upstream にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

【0085】(8) ヒト化抗体の一過性 (トランジェント) 発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターをCOS-7細胞(ATCC CRL1651)に導入してヒト化抗体の一過性発現[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p.283, 1991]を行い、その活性を測定することができる。

【0086】COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p.283, 1991]、リポフェクション法[プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス[Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413 (1987)]等があげられる。ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の酵素免疫測定法(ELISA法)等により測定することができる。

【0087】(9)ヒト化抗体の安定(ステーブル)発現および活性評価

前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

【0088】ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下、DHFR遺伝子と称す)が欠損したCHO細胞[プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 77, 4216 (1980)]、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と称す)等があげられる。

【0089】ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418およびFCSを含むRPMI1640培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0090】ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる[ア

ンチボディズ(Antibodies), A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988; 以下、「アンチボディズ」と記す]。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のB鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)[ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]やウエスタンブロッティング法(アンチボディズ, Chapter 12, 1988)等で測定する。精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体のVEGFに対する阻害活性の測定は前記1(4)に記載の方法などにより測定することができる。

【0091】(10)ヒト化抗体の使用方法

本発明のヒト化抗体はヒトVEGF受容体KDRと特異的に結合し、KDRの作用を中和する。このため、本発明により提供されるヒト化抗体は固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾眼など過剰なVEGF産生による血管新生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内で免疫原性を示さず、その効果が長期間にわたり持続することが期待される。本発明のヒト化抗体は単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0092】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0093】経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0094】カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコー



ル、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

【0095】座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg $\sim$ 8mg/kgである。

【0096】3. 抗ヒトVEGF受容体KDR 一本鎖抗体の作製

(1) 一本鎖抗体発現ベクターの構築

前記2(2)、2(5)および2(6)に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型CDR移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

【0097】選択された発現用ベクターに、VH-P-VLあるいはVL-P-VH (Pはペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードするcDNAを適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の

一本鎖抗体をコードするcDNAが挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。一本鎖抗体をコードするcDNAは、VHをコードするcDNAとVLをコードするcDNAとを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成DNAを用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加がVH、VLの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばPantolianoらにより示されたもの [バイオケミストリー (Biochemistry), 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

【0098】(2) 一本鎖抗体の発現および活性評価  
前記3(1)で構築した一本鎖抗体発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等の方法により適切な宿主細胞へ導入することにより、目的の一本鎖抗体を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる一本鎖抗体の活性は前記1(4)に記載の方法等により測定することができる。

【0099】本発明の一本鎖抗体の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、一本鎖抗体が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒(インクルージョン・ボディ)として存在している一本鎖抗体は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄を繰り返し、例えばグアニジン塩酸による可溶化、および再度一本鎖抗体の活性を有する構造へと導く操作、それに続く活性分子の精製によって達成することができる。そして、精製された一本鎖抗体の活性は前記1(4)に記載の方法等により測定することができる。

【0100】(3) 一本鎖抗体の使用法

本発明の一本鎖抗体はヒトVEGF受容体KDR と特異的に結合し、KDRの作用を中和する。このため、本発明により提供される一本鎖抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など過剰なVEGF産生による血管新生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明の一本鎖抗体は単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法



により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0101】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0102】投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、 $p$ -ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0103】カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0104】非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

【0105】担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg $\sim$ 8mg/kgである。

【0106】4. 抗ヒトVEGF受容体KDR ジスルフィド安定化抗体の作製

#### (1) ジスルフィド安定化抗体の作製

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAあるいはヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAのそれぞれの適切な位置の1アミノ酸残基に相当するDNA配列をシステイン残基に相当するDNA配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前

記2(5)のPCRを用いた変異導入法により行うことができる。

【0107】得られた改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを組み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

【0108】(2) ジスルフィド安定化抗体の発現、活性評価

前記4(1)で構築されたジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平2-25789 1、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的のジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれるジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の発現は前記1(5)に記載の方法等により確認することができる。

【0109】ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることで達成することができる。例えば、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマト

グラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在しているジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

【0110】そして、精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L鎖を混合し、活性を有する構造へと導く操作 [refolding 操作, モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology), 32, 249 (1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1(5)に記載の方法等により測定することができる。

【0111】(3) ジスルフィド安定化抗体の使用法  
本発明のジスルフィド安定化抗体はヒトVEGF受容体KDRと特異的に結合し、KDRの作用を中和する。このため、本発明により提供されるジスルフィド安定化抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など過剰なVEGF産生による血管新生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明のジスルフィド安定化抗体は単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0112】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0113】経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0114】カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸

マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

【0115】座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg~8mg/kgである。

【0116】5. 抗ヒトVEGF受容体KDR 抗体を用いたヒトVEGF受容体KDR の検出および定量方法

また、本発明は、本発明の抗体を用いて、ヒトVEGF受容体KDRまたはヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法、可溶性ヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出および定量する方法、ヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRとの結合を阻害する方法およびヒトVEGF受容体KDR作用を中和する方法に関する。

【0117】本発明の抗体を用いて、ヒトVEGF受容体KDR、ヒトVEGF受容体KDRを細胞表面に発現した細胞または可溶性ヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987年)、統生化学実験講座5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986年)] などがあげられる。

【0118】蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0119】免疫酵素抗体法 (ELISA) とは、分離した細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗

体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法である。

【0120】放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

【0121】免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0122】ウェスタンブロッティング法とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを SDS-PAGE 等の電気泳動法により分画後、ニトロセルロース膜などに転写し、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素等を反応させ観察する方法である。

【0123】免疫沈降法とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに本発明の抗体を反応させ、さらに抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を結合させたセルロースなどのビーズを反応させた後、ビーズを回収することで本発明の抗体に反応した抗原を回収し、ウェスタンブロッティング法などにより抗原を解析する方法である。

【0124】また、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト VEGF 受容体 KDR を、上述した免疫学的に検出または定量する方法があげられる。また、本発明の抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断薬として用いることができる。

【0125】また、ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR との結合の阻害活性は、増殖因子と受容体の結合測定法 [ 新化学実験講座 7 増殖分化因子とその受容体 (東京化学同人、1991年) ] 等の方法に準じて、本発明の抗体を用いた VEGF-VEGF 受容体 KDR 結合阻害試験を行うことにより確認することができる。

【0126】すなわち、KDR を発現している細胞あるいは組織に放射性物質等を標識した VEGF を反応させ、KDR 発現細胞あるいは組織に結合した VEGF をシンチレーションカウンターなどで測定する方法である。放射性物質等

を標識した VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、放射性物質等を標識した VEGF が KDR に結合するのを阻害する活性を測定することが可能である。

【0127】VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害活性は、増殖因子受容体の自己リン酸化測定法 [ 統生化学実験講座 情報伝達と細胞応答 (東京化学同人、1986年) ] 等の方法に準じて、抗体を用いた、VEGF-VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害試験を行うことにより確認することができる。

【0128】すなわち、KDR を発現している細胞あるいは組織に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する KDR の自己リン酸化を免疫沈降法およびウエスタンブロット法などで検出する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF が結合することにより亢進される KDR の自己リン酸化を阻害する活性を測定することが可能である。

【0129】ヒト VEGF の生物活性の阻害活性は、VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖、遊走、およびチューブ形成試験 [ 新化学実験講座 10 血管 (内皮と平滑筋) (東京化学同人、1991年) ] を行うことにより確認することができる。

【0130】VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を細胞数を測定する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

【0131】VEGF 依存的な血管内皮細胞の遊走試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

【0132】VEGF 依存的な血管内皮細胞のチューブ形成試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

【0133】さらに、本発明は本発明の抗体を用いることを特徴とする、血管新生異常疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬あるいは治療薬に関する。

【0134】血管新生異常疾患とは、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など、過剰な VEGF で起こりうる血管新生の異常により病態が進行する疾患を示す。

【0135】血管新生異常疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒトVEGF受容体KDRを免疫学的に検出または定量する方法があげられる。また、本発明の抗体は、血管新生異常疾患の診断薬として用いることができる。

【0136】さらに、本発明の抗体はヒトVEGFの生物活性を阻害できるため、ヒトVEGFのKDRへの結合を阻害することで、KDR自己リン酸化を阻害した結果、VEGF依存的ヒト血管内皮細胞の増殖を阻害できるため、血管新生異常疾患の治療薬として用いることができる。以下、本発明の実施例を示す。

#### 【0137】

##### 【実施例】実施例1

1. 抗ヒトVEGF受容体KDR マウスモノクローナル抗体をコードするcDNAの単離および解析

(1) 抗ヒトVEGF受容体KDR マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマからのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Trackを用い、キットに添付の使用説明書に従って、参考例1で得られた抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体KM1992およびKM1995生産ハイブリドーマ（それぞれFERM BP-6217、FERM BP-6218）の各 $1 \times 10^6$ 細胞より、それぞれmRNAを取得した。

【0138】(2) 抗ヒトVEGF受容体KDR マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマのH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

実施例1の1(1)で取得したKM1992およびKM1995のmRNAの各5 $\mu$ gから、cDNA Synthesis Kit (ファルマシア

バイオテック社製)を用い、キットに添付の使用説明書に従って、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNA

をそれぞれ合成した。作製したそれぞれのcDNAの約6 $\mu$ gを10 $\mu$ lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片とL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約0.1 $\mu$ g回収した。次に、それぞれの約1.5kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gと、Lambda ZAPII Vector (Lambda ZAPII Vector をEcoRIで切断後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで処理したもの：ストラタジーン社製)の1 $\mu$ gをT4 ligase緩衝液(宝酒造社製)11.5 $\mu$ lに溶解し、T4 DNA ligase (宝酒造社製)175単位を加えて、12 $^{\circ}$ Cにて24時間インキュベートし、さらに室温にて2時間インキュベートした。それぞれの反応液のうち4 $\mu$ lを常法(モレキュラー・クローニング

第2版)に従い、Gigapack Gold Packaging Kit (ストラタジーン社製)を使用してラムダファージにパッケージングし、これらを常法(モレキュラー・クローニング第2版)に従って、Gigapack Gold Packaging Kit (ストラタジーン社製)に付属の大腸菌株XL1-Blue [Biotechniques, 5, 376 (1987)]に感染させて、KM1992およびKM1995のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライ

ブラリーとしてそれぞれ約 $4 \times 10^3$ 個のファージクローンを取得した。

【0139】(3) 抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマのH鎖およびL鎖をコードするcDNAのクローニング

実施例1の1(2)で作製したそれぞれのファージを常法(モレキュラー・クローニング第2版)に従い、ニトロセルロースフィルター上に固定した。各ニトロセルロースフィルターを用いてECL direct nucleic acid labeling and detection systems (アマシャム社製)に添付の使用説明書に従い、マウス免疫グロブリンのC領域をコードするcDNA [H鎖はマウスC $\gamma$ 1cDNAの断片 [Cell, 18, 559 (1979)] 及びマウスC $\gamma$ 2b cDNAの断片 [EMBO Journal, 3, 2047, 1984]、L鎖はマウスC $\kappa$ cDNAの断片 [Cell, 22, 197 (1980)] をプローブとしてそれと強く結合したファージクローンを取得した。次に、Lambda ZAPII Vector (ストラタジーン社製)に添付の使用説明書に従い、ファージクローンをプラスミドpBluescriptSK(-)に変換し、最終的にKM1992のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpBS1992HおよびKM1992のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpBS1992L、KM1995のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpBS1995HおよびKM1995のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドpBS1995Lを取得した。組換えプラスミドpBS1992Hを有する大腸菌DH5 $\alpha$  (東洋紡績社製) / pBS1992H、組換えプラスミドpBS1992Lを有する大腸菌DH5 $\alpha$  / pBS1992L、組換えプラスミドpBS1995Hを有する大腸菌DH5 $\alpha$  / pBS1995Hおよび組換えプラスミドpBS1995Lを有する大腸菌DH5 $\alpha$  / pBS1995Lは、それぞれFERM BP-6803、FERM BP-6804、FERM BP-6805、FERM BP-6806として、平成11年7月28日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

【0140】(4) 抗ヒトVEGF受容体KDR マウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAの可変領域の塩基配列の決定

実施例1の1(3)で得られた各抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAのV領域の塩基配列を、得られたプラスミドの0.1 $\mu$ gを用いてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライド バイオシステムズ社製)に添付の説明書に従って反応後、ABI PRISM<sup>TM</sup>377

(アプライド バイオシステムズ社製)により電気泳動し、決定した。決定したそれぞれのcDNAの塩基配列より、KM1992およびKM1995のVHおよびVLのアミノ酸配列を決定した。配列番号1にKM1992のVH、配列番号2にKM1992のVL、配列番号3にKM1995のVH、配列番号4にKM1995のVLのそれぞれをコードする塩基配列を、配列番号26にKM1992のVH、配列番号27にKM1992のVL、配列番号28にKM1995のVH、配列番号29にKM1995のVLのそれぞれのアミノ

酸配列を示す。

【0141】(5) 抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のCDR配列の同定  
実施例1の1(4)で決定した各抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列より、それぞれのVHおよびVLのCDR配列を既知の抗体のV領域のアミノ酸配列(シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することによって同定した。配列番号5、6および7にKM1992のVHのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号8、9および10にKM1992のVLのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号11、12および13にKM1995のVHのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号14、15および16にKM1995のVLのCDR1、CDR2およびCDR3のそれぞれのアミノ酸配列を示す。

【0142】2. 抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体の製造

ヒトVEGF受容体KDRに対する中和活性を有する抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体KM1992およびKM1995に由来する、抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体KM2992およびKM2995を以下のようにして製造した。

【0143】(1) 抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1992の構築  
W097/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および実施例1の1項で得られたプラスミドpBS1992HおよびpBS1992Lを用いて抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1992を以下のようにして構築した。

【0144】プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製)の3  $\mu$ gを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのApaI-NotI断片を約2  $\mu$ g回収した。次に、プラスミドpBS1992Hの5  $\mu$ gを50mMトリス-酢酸(pH7.9)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム、1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素BsmAI(ニューイングランドバイオラブズ社製)を加えて55°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのBsmAI-NotI断片を約0.5  $\mu$ g回収した。次に、配列番号17、

18に記載の塩基配列を有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3  $\mu$ gずつを15  $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu$ lと10mM ATP 2  $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【0145】上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-NotI断片0.1  $\mu$ gとプラスミドpBS1992H由来のBsmAI-NotI断片0.1  $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05  $\mu$ gを全量10  $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、図1に示したプラスミドpBS1992Holigoを得た。

【0146】次に、W097/10354に記載のプラスミドpKM1259LV0の3  $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100  $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SplI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI-SplI断片を約2  $\mu$ g回収した。次に、プラスミドpBS1992Lの5  $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.9)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム、1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素PflMI(ニューイングランドバイオラブズ社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液10  $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.38kbのPflMI-EcoRI断片を約0.5  $\mu$ g回収した。次に、配列番号19、20に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3  $\mu$ gずつを15  $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT]2  $\mu$ lと10mM ATP 2  $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【0147】上記で得られたプラスミドpKM1259LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1  $\mu$ g、プラスミドpBS1992L由来のPflMI-EcoRI断片0.1  $\mu$ gおよびリン酸化合成DNA0.05  $\mu$ gを全量10  $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換



し、図2に示したプラスミドpBS1992Loligoを得た。

【0148】次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSA および0.01% トライトンX-100 からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素Not I(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのApaI-NotI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1992Holigoの5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMDTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSA および0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのApaI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

【0149】上記で得られたヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBS1992Holigo由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、図3に示したプラスミドpKANTEX1992Hを得た。

【0150】次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1992Hの3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SplI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI-SplI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1992Loligoの5 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SplI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

【0151】上記で得られたプラスミドpKANTEX1992H由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ g、プラスミドpBS1992Loligo由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加

え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、図4に示したプラスミドpKANTEX1992を得た。

【0152】(2)抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1995の構築  
WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および実施例1の1項で得られたプラスミドpBS1995HおよびpBS1995Lを用いて抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1995を以下のようにして構築した。プラスミドpBS1995Hの5 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸(pH7.9)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム、1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素BsmBI(ニューイングランドバイオラプス社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのBsmBI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

【0153】次に、配列番号18、21に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT]2 $\mu$ lと10mM ATP 2 $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【0154】実施例1の2(1)で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBS1995H由来のBsmBI-NotI断片0.1 $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、図5に示したプラスミドpBS1995Holigoを得た。

【0155】次に、プラスミドpBS1995Lの5 $\mu$ gを20mMトリス-酢酸(pH7.9)、50mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、1mM DTTおよび32mM S-adenosylmethionineからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素BsgI(ニューイングランドバイオラプス社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素DsaI(ペーリンガー



・マンハイム社製)を加えて55°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.33kbのBsgI-DsaI断片を約0.5μg回収した。次に、プラスミドpBS1995Lの3μgを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液20μlに加え、10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させ、さらに10単位の制限酵素DsaI(ペーリンガー・マンハイム社製)を加えて55°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.1kbのEcoRI-DsaI断片を約1μg回収した。

【0156】配列番号22、23に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3μgずつを15μlの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2μlと10mM ATP 2μlを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

【0157】プラスミドpBS1995L由来のBsgI-DsaI断片0.1μg、プラスミドpBS1995L由来のEcoRI-DsaI断片0.1μgおよびリン酸化合成DNA 0.05μgを全量10μlの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、図6に示したプラスミドpBS1995Loligo1を得た。次に、プラスミドpBS1995Loligo1の5μgを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液20μlに加え、10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させ、さらに10単位の制限酵素DsaI(ペーリンガー・マンハイム社製)を加えて55°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.38kbのEcoRI-DsaI断片を約0.5μg回収した。

【0158】次に、配列番号24、25に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3μgずつを15μlの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2μlと10mM ATP 2μlを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase(宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpKM1259LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1μg、プラスミドKM1995Loligo1由来のEcoRI-DsaI断片0.1μgおよびリン酸化合成DNA 0.05μgを全量10μlの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミ

ドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、図7に示したプラスミドpBS1995Loligo2を得た。

【0159】次に、上記で得られたプラスミドpBS1995Hの5μgを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100μg/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのApaI-NotI断片を約0.5μg回収した。

【0160】実施例1の2(1)で得られたヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93由来のApaI-NotI断片0.1μgとプラスミドpBS1995H由来のApaI-NotI断片0.1μgを全量10μlの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、図8に示したプラスミドpKANTEX1995Hを得た。

【0161】次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1995Hの3μgを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100μg/ml BSAからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SplI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI-SplI断片を約1μg回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1995Loligo2の5μgを50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100μg/ml BSAからなる緩衝液10μlに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SplI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5μg回収した。

【0162】上記で得られたプラスミドpKANTEX1995H由来のEcoRI-SplI断片0.1μg、プラスミドpBS1995Loligo2由来のEcoRI-SplI断片0.1μgを全量10μlの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、図9に示したプラスミドpKANTEX1995を得た。

【0163】(3) pKANTEX1992およびpKANTEX1995を用いた抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体のラットミエローマYB2/0細胞(ATCC CRL1581)での発現YB2/0細胞への抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1992およびpKANTEX1995の導入は宮地

らの方法に従い、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] にて行った。

【0164】実施例1の2項(1)および(2)で得られたpKANTEX1992およびpKANTEX1995の5  $\mu$ g をそれぞれ  $4 \times 10^6$  個のYB2/0細胞へ導入後、10mlのHSFM-FCS (10) 培地 [牛胎児血清(FCS)を5% 含むHybridoma SFM培地 (ギブコ社)] に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (スミロン社製) に100  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、24時間培養後、ジェネティシン (以下、G418と表記する、ギブコ社製) を0.5mg/mlになるように添加してさらに1週間培養した。G418耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体の活性を以下に示す酵素免疫測定法により測定した。

#### 【0165】酵素免疫測定法

参考例1(18)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7NをPBSで2  $\mu$ g/mlに希釈し、96ウェルのEIA用プレート (グライナー社製) に50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1% BSAを含むPBS (以下、1%BSA-PBSと表記する) を100  $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清を50  $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween20を含むPBS (以下、0.05% tween-PBSと表記する) で洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体 (アメリカン コーレックス社製) を50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後、ABTS基質液 [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を50  $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE max (モレキュラー・デバイシーズ社製) を用いて測定した。

【0166】培養上清中に抗ヒトVEGF受容体KDR ヒト型キメラ抗体の活性が認められた形質転換株については2回の限界希釈法によるクローニングを経て、最終的な抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体を生産する形質転換細胞株とした。発現ベクターpKANTEX1992を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち、抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体KM1992由来の抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2992があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体をKM2992と命名した。また、発現ベクターpKANTEX1995を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち抗ヒトVEGF受容体KDRマウスモノクローナル抗体KM1995由来の抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2995があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体をKM2995と命名した。得られた各形質転換細胞クローンの抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体

の生産性は約0.1~5  $\mu$ g/10<sup>6</sup>細胞/24時間であった。

【0167】(4) 抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体のヒトVEGF受容体KDRおよびヒトVEGF受容体Flt-1に対する結合活性

抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992およびKM2995のヒトVEGF受容体KDRおよびヒトVEGF受容体Flt-1に対する結合活性を以下の手順に従い、確認した。可溶性ヒトFlt-1-7NはTanakaらの方法 [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867(1997)] に従い調製した。可溶性ヒトKDR-7Nおよび可溶性ヒトKDR-7N-Fcは参考例1(18)により調製した。酵素免疫測定法を用いて、96ウェルのEIA用プレートに吸着した一定量の可溶性ヒトKDR-7Nおよび可溶性ヒトFlt-1-7Nに対し、濃度を変化させたヒト型キメラ抗体を添加して結合活性を検討した。96ウェルのEIA用プレート (グライナー社製) に、PBSで希釈した2  $\mu$ g/mlの可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nおよび可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1-7Nを50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1% BSA-PBSを100  $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、1%BSA-PBSにより10~0.0006  $\mu$ g/mlに希釈した抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992および0.25~0.004  $\mu$ g/mlに希釈した抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2995を50  $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体 (アメリカン コーレックス社製) を50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させた後、0.05% tween-PBS で洗浄し、ABTS基質液 [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を50  $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE max (モレキュラー・デバイシーズ社製) を用いて測定した。

【0168】その結果を図10に示す。抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992 (図10(A)) およびKM2995 (図10(B)) は抗体濃度依存的にヒトVEGF受容体KDR-7Nに反応し、ヒトVEGF受容体Flt-1-7Nには反応せず、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体の抗原特異性が確認された。

【0169】次に、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合阻害試験を以下のようにして検討した。96ウェル・マルチスクリーニングIPプレート (ミリポア社製) にメタノールを25  $\mu$ l/ウェルで分注してプレート底部のPVDF膜を浸した後、メタノールを除去してPBSで洗浄し、親水処理を施した。PBS で2  $\mu$ g/mlの濃度に希釈した可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcを50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを200  $\mu$ l/ウェル加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で10~0.016  $\mu$ g/mlに希釈した抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型化

キメラ抗体KM2992あるいは0.4~0.016 $\mu$ g/mlに希釈した抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型化キメラ抗体KM2995を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、さらに、3 ng/mlの<sup>125</sup>I標識ヒトVEGF (アマシャム社製)を50 $\mu$ l/ウェルに加え室温で2.5時間反応させた。

【0170】PBSで洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (バックード社製)を40 $\mu$ l/ウェルに加え、トップカウント (バックード社製)を用いて、各ウェルに結合した<sup>125</sup>I標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。その結果を図11に示す。抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型化キメラ抗体KM2992 (図11(A)) およびKM2995 (図11(B))を添加することにより<sup>125</sup>I-VEGFの結合活性が低下することが認められ、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型化キメラ抗体KM2992およびKM2995は抗体濃度依存的にヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合を阻害した。

#### 【0171】参考例1

##### 1. 抗原の調製

抗原として可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体および可溶性ヒトVEGF受容体KDR各種誘導体を以下のようにして調製した。

【0172】(1)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~738番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcと称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から7個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0173】ヒトVEGF受容体KDRの完全長cDNAをコードするcDNAクローンBCMGS-neo-KDR (A.Sawano; Cell Growth & Differentiation 7, 213-221, 1996)をEcoRIで切断し、KDRの細胞外領域及び膜結合領域をコードする約2.8 kbの断片をpUC18のEcoRI部位に組み込むことによって、pUC-KDRを作製した。pUC-KDRをXhoIで切断し、Klenow処理後、XbaIリンカー (配列番号30) を挿入することによってpUC-KDR-Xbを作製した。pUC-KDR-XbのXbaI-BamHI (2.3 kbp) 断片をpBluescriptII KS(+)のXbaI/BamHI部位に挿入した後、SphI-BamHI (5.2 kbp) 断片を調製し、SnaBI部位を含む合成リンカー (配列番号31及び配列番号32) を挿入し、pBS-KDR-Xb-Sを作製した。pBS-KDR-Xb-SのXbaI/SnaBI (2.3 kbp) 断片、プラスミドpAMoP RFc [T. Yago; The Journal of Immunology 158, 707-714(1997)] 上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI (0.7 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL13

93プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-7N-Fcを構築した (図12)。

【0174】(2)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-6Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~638番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-6N-Fcと称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-6N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から6個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0175】配列番号33及び配列番号34に示した塩基配列を有するプライマー10 pmol、pBS-KDR-Xb-S (抗原の調製(1)参照) DNA 10ng、及び、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む10mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V)ゼラチン溶液100  $\mu$ lに2.5 units Taqポリメラーゼを加えた。反応は95℃で5分間の前処理した後、95℃で90秒間、50℃で90秒間、最後に72℃で90秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を30回繰り返す、DNA断片を回収した。本DNA断片をEcoT22IとSnaBIで切断し、80 bpのEcoT22I/SnaBI断片を得た。本DNA断片及びpBS-KDR-Xb-S (抗原の調製(1)参照) のEcoT22I/SnaBI (5.2 kbp) 断片を連結させpBS-KDR(6N)Lを作製した。pBS-KDR(6N)LのXbaI/SnaBI (2.0 kbp) 及びpAMoP RFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-6Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-6N-Fcを構築した。

【0176】(3)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~518番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5N-Fcと称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から5個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

胞外領域のN末端側から5個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0177】pUC-KDR-XbのEcoRI/HincII（1.9 kbp）断片及び配列番号35及び配列番号36の塩基配列を有する合成リンカーをベクターpBluescriptII SK（-）のEcoRI/NotI部位に挿入し、pBS-KDR-5Nを構築した。pBS-KDR-5NのXbaI/SnaBI（1.9 kbp）断片及びpAmoPRFc（抗原の調製（1）参照）上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-5N-Fcを構築した。

【0178】（4）可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1～393番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、2アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から4個のイムノグロブリン様部位及び2アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0179】配列番号37および配列番号38に示した塩基配列を有するプライマー10 pmol、pUC-KDR-Xb DNA 10 ng、及び、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸（deoxy nucleotide triphosphates）を含む10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001 %（W/V）ゼラチン溶液100 μlに2.5 units Taqポリメラーゼを加えた。反応は95℃で5分間の前処理した後、95℃で90秒間、50℃で90秒間、最後に72℃で90秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）を30回繰り返す。DNA断片を回収した。このDNA断片をHindIIIとKpnIにより切断し、520 bpのHindIII-KpnI DNA断片を得た。本DNA断片と、pAmoPRFc上のヒト抗体のFc領域をコードするKpnI/NotI（0.7 kbp）断片とをベクターpAmoPRFc（抗原の調製（1）参照）のHindIII/NotI部位に挿入し、pAmo-4N-Fcを構築した。pAmo-4N-FcのHindIII/NotI（1 kbp）及びpUC-KDR-XbのXbaI/HindIII（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-4N-Fcを構築した。

【0180】（5）可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1～294番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から3個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0181】pUC-KDR-Xb（抗原の調製（1）参照）のEcoRI/EcoT14I（1.2 kbp）断片及び配列番号39及び配列番号40の塩基配列を有する合成リンカーをpBluescriptII SK（-）のEcoRI/NotI部位に挿入し、pBS-KDR-3Nを構築した。pBS-KDR-3NのXbaI/SnaBI（1.2 kbp）断片及びpAmoPRFc（抗原の調製（1）参照）上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI（0.7 kbp）断片をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-3N-Fcを構築した。

【0182】（6）可溶性ヒトVEGF受容体KDR-2Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1～194番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-2N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-2N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から2個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0183】pUC-KDR-Xb（抗原の調製（1）参照）のEcoRI/VspI（0.9 kbp）断片及び配列番号41及び配列番号42の塩基配列を有する合成リンカーをpBluescriptII SK（-）のEcoRI/NotI部位に挿入し、pBS-KDR-2Nを構築した。pBS-KDR-2NのXbaI/SnaBI（0.9 kbp）断片及びpAmoPRFc（抗原の調製（1）参照）上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-2Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-2N-Fcを構築した。

【0184】(7)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~104番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-1N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-1N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から1個のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0185】pBS-KDR-2N（抗原の調製(6)参照）のBglII/NotI（2.8 kbp）断片に、配列番号43及び配列番号44の塩基配列を有する合成リンカーを連結し、pBS-KDR-1Nを構築した。pBS-KDR-1NのXbaI/SnaBI（0.4 kbp）断片及びpAMoAPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-1N-Fcを構築した。

【0186】(8)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fc（抗原の調製(1)参照）から、N末端側から1番目のイムノグロブリン様部位を形成する31番目のアミノ酸から102番目のアミノ酸までの計72個のアミノ酸を欠失させたKDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から2~7番目のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0187】配列番号45及び配列番号46に示した塩基配列を有するプライマー10 pmol、pVL-KDR-7N（抗原の調製(14)参照）DNA 10 ng、及び、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸（deoxynucleotide triphosphates）を含む10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V)ゼラチン溶液100  $\mu$ lに2.5 units Taqポリメラーゼを加えた。反応は95°Cで5分間の前処理した後に、95°Cで90秒間、50°Cで90秒間、最後に72°Cで90秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）を30回繰り返し、DNA断片を回収した。本DNA断片をXbaIとBglIIで切断し、0.8 kbpのXbaI/BglII断

片を得た。本DNA断片及びpVL-KDR-5N（抗原の調製(17)参照）のBglII/NotI（1.6 kbp）断片をpBluescriptII SK(-)のXbaI/NotIに挿入し、pBS-KDR-5  $\Delta$ 1Nを作製した。pBS-KDR-5  $\Delta$ 1NのXbaI/HincII（1.6kbp）断片及びpVL-KDR-7N-Fc（抗原の調製(1)参照）のHincII/NotI（1.2 kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-7  $\Delta$ 1N-Fcを構築した。

【0188】(9)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5  $\Delta$ 1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5N-Fc（抗原の調製(3)参照）から、N末端側から1番目のイムノグロブリン様部位を形成する31番目のアミノ酸から102番目のアミノ酸までの計72個のアミノ酸を欠失させたKDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5  $\Delta$ 1N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5  $\Delta$ 1N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から2~5番目のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0189】pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N（抗原の調製(8)参照）のXbaI/NotI（1.4 kbp）断片及びpAMoAPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI（0.7kbp）をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5  $\Delta$ 1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-5  $\Delta$ 1N-Fcを構築した。

【0190】(10)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4  $\Delta$ 1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターの構築  
可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4N-Fc（抗原の調製(4)参照）から、N末端側から1番目のイムノグロブリン様部位を形成する31番目のアミノ酸から102番目のアミノ酸までの計72個のアミノ酸を欠失させたKDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4  $\Delta$ 1N-Fcと称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4  $\Delta$ 1N-Fcは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から2~4番目のイムノグロブリン様部位及び2アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体Fc領域から成る融合タンパク質に相当する。

【0191】抗原の調製(8)で回収したXbaI/BglII-PCR断片（0.8 kbp）及びpVL-KDR-4N（抗原の調製(18)参

10

20

30

40

50



照) のBglII/NotI (0.9 kbp) 断片をpBluescriptII SK (-)のXbaI/NotIに挿入し、pBS-KDR-4 Δ1Nを作製した。pBS-KDR-4 Δ1NのXbaI/KpnI (1.0kbp) 断片及びpAMoAPR Fc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体のFc領域をコードするSnaBI/NotI (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4 Δ1Nとヒト抗体Fc領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-4 Δ1N-Fcを構築した。

【0192】(11)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~738番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片(以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nと称す)及びリンカー由来の2アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から7個のイムノグロブリン様部位に相当する。

【0193】pBS-KDR-Xb-S (抗原の調製(1)参照) をSnaBI/BamHIで切断し、終止コドンとNotI部位とを含む合成リンカー(配列番号47及び配列番号48)を組み込み、pBS-KDR(Xb)-S-Nを作製した。pBS-KDR-Xb-S-NのXbaI-NotI (2.3 kb) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N発現ベクターpVL-KDR-7Nを作製した。

【0194】(12)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N' 発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~714番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片(以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N' と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N' は、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から7個目のイムノグロブリン様部位の約2/3までに相当する。

【0195】pUC-KDR-XbをStuI及びSphIで切断し、終止コドン及びNotI部位を含む合成リンカー(配列番号49及び配列番号50)を挿入した。XbaI-NotI (2.2 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N' 発現ベクターpVL-KDR-7N' を作製した。

【0196】(13)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5N発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~518番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片(以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5Nと称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から5個のイムノグロブリン様部位に相当する。

【0197】pUC-KDR-XbのEcoRI-HincII (1.9 kb) 断片及びSnaBI部位、終止コドン、NotI部位を含む合成DNA (配列番号51及び配列番号52をpBluescriptII SK(-)のEcoRI/NotI部位に挿入し、pBS-KDR-5Nを作製した。pBS-KDR-5NのXbaI-NotI (1.6 kb) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-5N発現ベクターpVL-KDR-5Nを作製した。

【0198】(14)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4N発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~393番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片(以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4Nと称す)及びリンカー由来の2アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から4個のイムノグロブリン様部位に相当する。

【0199】pAMo-4N-Fc (抗原の調製(4)参照) のXbaI/KpnI (1.2 kb) 断片及び配列番号53及び配列番号54の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-4N発現ベクターpVL-KDR-4Nを作製した。

【0200】(15)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3N発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する配列番号56記載の19アミノ酸及び成熟体ヒトVEGF受容体KDRである、配列番号55記載のアミノ酸配列1~294番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片(以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3Nと称す)及びリンカー由来の2アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から3個のイムノグロブリン様部位に相当する。

【0201】pBS-KDR-3N (抗原の調製(5)参照) のXbaI/SnaBI (1.2 kb) 断片、配列番号47及び配列番号48の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺



伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側BglII部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-3N発現ベクターpVL-KDR-3Nを作製した。

【0202】(16)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1N発現ベクターの構築

可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N (抗原の調製(14)参照) から、N末端側から1番目のイムノグロブリン様部位を形成する31番目のアミノ酸から102番目のアミノ酸までの計72個のアミノ酸を欠失させたKDR断片、6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) 及びヒト抗体Fc領域を構成する227アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1Nと称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7  $\Delta$ 1Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から2~7番目のイムノグロブリン様部位及び6アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー#1) から成る融合タンパク質に相当する。

【0203】pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N (抗原の調製(9)参照) のXbaI/HincII (1.6 kbp) 断片及びpVL-KDR-7N (抗原の調製(14)参照) のHincII/NotI (0.67 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL1393プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7D1N発現ベクターpVL-KDR-7D1Nを作製した。

【0204】(17)昆虫細胞による可溶性ヒトVEGF受容体KDR発現を行うための組み換えウイルスの作製  
昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードするcDNAを特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウイルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウイルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマンジェン社製バキュロゴールドスターキット (製品番号PM-21001K) を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

【0205】TMN-FHインセクトメディウム (ファーマンジェン社製) にて培養した昆虫細胞Sf9 (ファーマンジェン社製) に線状バキュロウイルスDNA [バキュロゴールド・バキュロウイルスDNA (BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製] および作製したトランスファーベクターDNA をリポフェクティン法にて導入すること [蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)] により行い組み換えバキュロウイルスを以下のように作製した。

【0206】(1)で作製した発現ベクターの1 $\mu$ gと線状バキュロウイルスDNA の20ngとを12 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、さらにリポフェクティン6 $\mu$ lと蒸留水6 $\mu$ lとを混和したものを加え室温で15分間放置した。一方Sf9 細胞1  $\times$  10<sup>6</sup>個を2ml のSf900-II培地 [ギブコ (Gibco) 社製] に懸濁し、直径35mmの細胞培養用プラスチックシャーレに

入れた。ここに上記のプラスミドDNA、線状バキュロウイルスDNA およびリポフェクティン混和溶液全量を加え27°Cで3日間培養後、組み換えウイルスを含む培養上清1mlを採取した。シャーレには新たにSf900-II培地1mlを加え、さらに27°Cで3日間培養し組み換えウイルスを含む培養上清をさらに1.5ml 得た。さらに、(2)~(16)で作製した発現ベクターを用い同様の操作を行った。

【0207】次に蛋白質発現に用いるために得られた組み換えウイルスを各々、以下の手順で増殖させた。

10 【0208】Sf9細胞2 $\times$ 10<sup>7</sup>個を10mlのSf900-II培地に懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ (グライナール社製) に入れて室温で1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに15mlのTMN-FHインセクトメディウムと上記の組み換えウイルスを含む培養上清のうち1mlを加え27°Cで3日間培養した。培養後上清を1,500 $\times$ gで10分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウイルス溶液を得た。

20 【0209】得られた組み換えウイルス溶液についてウイルスの力価をバキュロゴールドスターキット・マニュアル (ファーマンジェン社製) に記載の方法で算定した。

30 【0210】Sf9細胞6 $\times$ 10<sup>6</sup>個を4mlのSf900-II培地に懸濁し、直径60mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たにSf900-II培地400 $\mu$ lとSf900-II培地で1000倍に希釈した上記組み換えウイルス溶液を加え室温で1 時間放置した後、培地を除き5mlの1%低融点アガロース [アガーブラーク・アガロース (Agarplaque Agarose)、ファーマンジェン社製] を含む培地 [滅菌した1ml の5%アガーブラークプラス・アガロース水溶液と4mlのTMN-FHインセクトメディウムを混和し、42°Cに保温したもの] を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27°Cで6日間培養した。該シャーレに0.01% ニュートラルレッドを含むPBS 1mlを加えさらに1 日培養した後、出現したブラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウイルス溶液はいずれも約1 $\times$ 10<sup>7</sup>ブラークフォーミングユニット (以下、PFU と称す) /ml のウイルスを含んでいることがわかった。

【0211】(18) 昆虫細胞における可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、および、可溶性ヒトVEGF受容体KDR各種誘導体の発現、精製

1 (1) ~ (16) で示した可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、および、可溶性ヒトVEGF受容体KDR各種誘導体は以下のようにして得た。High Five細胞4 $\times$ 10<sup>7</sup>個を175cm<sup>2</sup>フラスコ (グライナール社製) 中のEX-CELL<sup>TM</sup>400培地 (JRH Bioscience社製) 30mlに懸濁し、室温で1時間放置し、フラスコに付着させた。(1) ~ (16) で得られたトランスファーベクター由来の組み換えウイルスを約

1~3×10<sup>6</sup>PFU/mlの濃度で含む溶液を1ml加え、室温で2時間感染させた。培養上清を除き新たに30mlのEX-CELL™400培地30mlを加え27℃にて3~4日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し1,500×gで10分間遠心分離を行い上清を得た。

【0212】可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体については、プロセップAカラムを用いて以下のように精製した。カラムに約1mlのプロセップA[Bioprocessing社製]を充填し、10mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)を用いて1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した可溶性ヒトVEGF受容体KDRを含む培養液500~1000mlを100ml/時の流速でプロセップAカラムに通塔した。さらに10mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)を用いて1ml/分の流速で洗浄した後、50mMクエン酸緩衝液(pH3)を7ml通塔し、プロセップAカラムに吸着した蛋白質の溶出を行った。各分画に含まれる蛋白をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析した。

【0213】可溶性ヒトVEGF受容体KDR各種誘導体については、以下のように精製した。50mlのDEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech社製)を充填したカラムが液の入口側に、40mlのHeparin Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech社製)を充填したカラムが出口側になるように直列に接続し、300mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した。洗浄後、可溶性ヒトVEGF受容体KDRを含む培養液400~800mlを50~100ml/時の流速で通塔した。更に、300mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した後、Heparin Sepharose CL-6Bカラムのみに400mlの0~1M NaCl/20mMリン酸ナトリウム緩衝液にて連続濃度勾配をかけ、吸着蛋白質の溶出を行った。溶出液は7mlずつ分画し、各分画に含まれる蛋白質をSDS-PAGEにて解析し、可溶性ヒトVEGF受容体KDRを含む分画を60~80ml回収した。回収した精製分画はセントリプレップ10(アミコン社製)を用いて濃縮し、可溶性ヒトKDR3N、KDR4N、KDR5N、KDR7N'およびKDR7Nを溶液としてそれぞれ2.8ml、8ml、5.5ml、4mlおよび4.8ml(蛋白質濃度/純度は345.5μg/ml/30%、264μg/ml/50~60%、380.5μg/ml/70%、1.59mg/ml/60%および815μg/ml/70~80%)得た。取得した可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、および、可溶性ヒトVEGF受容体KDR各種誘導体の模式図は図13および図14に示した。

【0214】(19)可溶性ヒトVEGF受容体KDRの純度の確認

精製可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fcの純度をSDS-PAGEを用いて確認した。SDS-PAGEは文献記載の方法[Anticancer Research, 12, 1121 (1992)]に従った。ゲルには5~20%グラジエントゲル(アトー社製)を用い、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として2μgのKDR-Fcそれぞれ泳動し、グーマシーブリリアントブルーにて染色した。図15に結果を示した。KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-

4N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-5Δ1N-Fc、KDR-4Δ1N-Fcの純度は95%以上であった。

【0215】(20)対照抗原蛋白の精製

対照抗原蛋白は以下のようにして得た。High Five細胞4×10<sup>7</sup>個を175cm<sup>2</sup>フラスコ(グライナー社製)中のEX-CELL™400培地(JRH Bioscience社製)30mlに懸濁し、室温で1時間放置し、フラスコに付着させ、27℃にて3~4日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し1,500×gで10分間遠心分離を行い上清を得た。

【0216】カラムにヘパリン-セファロースCL-6Bゲル(Pharmacia Biotech AB社製)約20mlを充填し、200mlの20mMトリス-塩酸(pH7.5)緩衝液で0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したHigh Five細胞の培養液500mlを0.5ml/分の流速でヘパリン-セファロースCL-6Bカラムに通塔した。さらに200mlの0.2M NaClを含む20mMトリス-塩酸(pH7.5)で0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M NaClを含む20mMトリス-塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を200ml通塔し、ヘパリン-セファロースに吸着した蛋白質を溶出した。1M NaCl溶出画分をセントリプレップ10(アミコン社製)を用いて濃縮し対照抗原蛋白を蛋白濃度867μg/mlの溶液として7ml得た。

【0217】(21)可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体のヒトVEGF結合活性の確認

(18)で取得した可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体(KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-5Δ1N-Fc、KDR-4Δ1N-Fc、KDR-2Δ1N-Fc)のヒトVEGF結合活性を以下の(21-1)VEGF結合阻害試験、(21-2)VEGF結合試験により確認した。

【0218】(21-1)VEGF結合阻害試験

96ウェル・イムオビロン™-Pフィルトレーション・プレート(96-well Immobilon™-P Filtration Plate; ミリポア社製)にメタノールを100μl/ウェルで分注し、プレート底部のPVDF膜を親水化した。水で洗浄後、PBS希釈4μg/ml可溶性ヒトKDR-7N-Fcを50μl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSを200μl/ウェルに加え、室温30分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、(18)で取得した精製可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体(KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-5Δ1N-Fc、KDR-4Δ1N-Fc、KDR-2Δ1N-Fc)を50μl/ウェルで分注し(最終濃度0.05~6.25μg/ml)、さらに、<sup>125</sup>I標識ヒトVEGF(最終濃度4ng/ml:アマシャム社製)を50μl/ウェルに加え、室温で1.5時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0(パッカード社製)を10μl/ウェルに加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した<sup>125</sup>I標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。

【0219】結果を図16に示す。KDR-7N-Fc、KDR-5Δ1N

-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4N-Fcは濃度依存的に<sup>125</sup>I標識ヒトVEGFの可溶性ヒトKDR7N-Fcへの結合を阻害することが示された。一方、KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fcは全く結合阻害活性を示さなかった。結合阻害活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fcの順番であった。従って、VEGFのKDRへの結合には、少なくともN末から1番目、6番目、7番目のIg様ドメインは関与しないことが示された。また、N末から2、3、4番目のIg様ドメイン(N末端アミノ酸から103~393番目)があればVEGFに結合できることが示された。

#### 【0220】(21-2) VEGF結合試験

96ウェル・イムビロン™-P フィльтраーション・プレート(96-well Immobilon™-P Filtration Plate; ミリポア社製)にメタノールを100 $\mu$ l/ウェルで分注し、プレート底部のPVDF膜を親水化した。水で洗浄後、PBS希釈した0.1~12.5 $\mu$ g/mlの(18)で取得した精製可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体(KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc)を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSを200 $\mu$ l/ウェルに加え、室温3分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、<sup>125</sup>I標識ヒトVEGF(最終濃度4ng/ml: アマシャム社製)を50 $\mu$ l/ウェルに加え、室温で1.5時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0(バックカード社製)を10 $\mu$ l/ウェルに加え、トップカウンタ(バックカード社製)を用いて、各ウェルに結合した<sup>125</sup>I標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。

【0221】結果を図17に示す。KDR-7N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4N-Fcは濃度依存的に<sup>125</sup>I標識ヒトVEGFに結合することが示された。一方、KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fcは全く結合活性を示さなかった。結合活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc = KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fcの順番であった。従って、VEGFのKDRへの結合には、少なくともN末から1番目、6番目、7番目のIg様ドメインは関与しないことが示された。また、N末から2、3、4番目のIg様ドメイン(N末端アミノ酸から103から393番目)があればVEGFに結合できることが示された。

【0222】(22) 昆虫細胞におけるヒトVEGFの発現  
ヒトVEGFは以下のようにして得た。High Five細胞4 $\times$ 10<sup>7</sup>個を175cm<sup>2</sup>フラスコ(グライナー社製)にEX-CELL™400培地(JRH Bioscience社製)30mlに懸濁し、室温で1時間放置し、フラスコに付着させた。文献[セル・グロース・アンド・ディファレンシエーション(Cell Growth & Differentiation), 7, 213 (1996)]記載の方法により得られたヒトVEGF組み換えバキュロウイルス溶液を約

1~3 $\times$ 10<sup>8</sup>PFU/mlの濃度で含む溶液を1ml 加え、室温で2時間感染させた。培養上清を除き新たに30mlのEX-CELL™400培地30mlを加え27℃にて3~4日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し1,500 $\times$ gで10分間遠心分離を行い上清を得た。

【0223】カラムに約40mlのヘパリンセファロースCL-6Bゲル[ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB社製]を充填し、400mlの20mM トリス-塩酸(pH7.5) からの緩衝液を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したヒトVEGFを含む培養液1500mlを0.5ml/分の流速でヘパリンセファロースCL-6Bカラムに通塔した。さらに400mlの20mM トリス-塩酸(pH7.5)を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した後、0.2M、0.5Mおよび1MのNaCl含有20mM トリス-塩酸(pH7.5)からの緩衝液各120 mlを順次通塔し、ヘパリンセファロースに吸着した蛋白質を段階的に溶出を行うと共に8mlずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、ヒトVEGFを含む分画(0.5~1M NaCl画分)を120ml回収した。セントリプレッス-10(アミコン社製)で濃縮後、ヒトVEGFを溶液として4ml(蛋白濃度1.2 mg/ml)得た。

#### 【0224】2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

1(18)で得られた各種抗原10~50 $\mu$ g をそれぞれアルミニウムゲル2mg および百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>9</sup>細胞とともに5週令雌BALB/c(日本S L C社製)、B6C3F1マウス(日本チャールズリバー社製)あるいは雌SDラット(日本S L C社製)に投与し、2週間後より10~50 $\mu$ gの蛋白質を1週間に1回、計4回投与した。また、NIH3T3-KDR細胞1 $\times$ 10<sup>7</sup>個を5週令雌BALB/c(日本S L C社製)3匹に投与し、計6回投与した。眼底静脈叢、心臓、あるいは、尾静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、3.で示す酵素免疫測定法により十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。なお、NIH3T3-KDR細胞を投与した5週令雌BALB/cでは免疫がかからず、可溶性KDRに対する抗体価は上昇しなかった。

【0225】脾臓をMEM 培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(1,200rpm、5分間)した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

#### 【0226】3. 酵素免疫測定法

1(18)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として、1(18)の昆虫細胞培養上清より得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体を用いた。96ウェルのEIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS希釈1~10 $\mu$ g/ml可溶性ヒトVEG-

F受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体および対照抗原として1 (20) で得られたHigh Five細胞培養上清のヘパリンカラム吸着画分、あるいは、抗GD3マウスヒトキメラ抗体KM871 [Cancer Immunology and Immunotherapy, 36, 373(1993)] をそれぞれ50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSを100 $\mu$ l/ウェルに加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清を50 $\mu$ l/ウェルで分注し2時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン (ともにDAKO社製) を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後ABTS基質液 [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を用いて発色させOD415nmの吸光度E max [モレキュラー・デバイシース (Molecular Devices)社製] を測定した。

【0227】4. マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3-U1 を正常培地で培養し、細胞融合時に $2 \times 10^7$ 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

【0228】5. ハイブリドーマの作製

2.で得られたマウス脾細胞あるいはラット脾細胞と4.で

得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離 (1,200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 $^{\circ}$ Cで、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM 培地2ml およびDMSO 0.7mlの混液0.2 ~ 1ml/10 $^6$ マウス脾細胞を加え、1 ~ 2 分間毎にMEM 培地1 ~ 2ml を数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。遠心分離 (900rpm、5 分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞をHAT 培地100ml中に懸濁した。

【0229】6. Binding ELISAによるハイブリドーマスクリーニング

5.で得られた懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間5%CO<sub>2</sub>下で培養した。この培養上清を3に記載した酵素免疫測定法で調べ、1(18)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体に特異的に反応し、かつ1 (20) で得られた対照抗原に反応しないウェルを選び、さらにHT培地と正常培地に換え、2回クローニングを繰り返して、抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。以下にその結果を示す。

【0230】

【表1】

動物	品数	免疫原	スクリーニング法	スクリーニングしたウエル数	成立したハイブリドーマ数
SDラット	3	KDR(7N)	Binding ELISA	3024	4 (KM1860~1863)
SDラット	2	KDR(7N)		2016	1 (KM1867)
Balb/cマウス	1	KDR(2N)-Fc		420	7 (KM1855~1865)
Balb/cマウス	1	KDR/NIH3T3 cell		504	1 (KM1859)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)		420	1 (KM1864)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)-Fc		420	2 (KM1855, 1866)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)		840	1 (KM1868)
Balb/cマウス	2	KDR(2N)-Fc		840	1 (KM1768)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)		840	2 (KM1825, 1828)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)-Fc		840	4 (KM1827~1830)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)		840	14 (KM1831~1838, 1853~1858)
Balb/cマウス	4	KDR(5N)		1680	10 (KM1843~1850, 1932, 1933)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)		420	3 (KM1778~1780)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)-Fc		504	3 (KM1987~1989)
Balb/cマウス	1	KDR(5N)-Fc		420	1 (KM1942)
Balb/cマウス	3	KDR(5N)		1260	6 (KM1843~1850)
Balb/cマウス	3	KDR(7N)-Fc		1260	11 (KM1885~1875)
B6C3F1マウス	1	KDR(7N)-Fc	VEGF-KDR結合阻害試験	420	0
B6C3F1マウス	1	KDR(5Δ1N)-Fc		420	7 (KM1881~1887)

【0231】1(18)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体およびKDR-NIH3T3細胞を免疫したBalb/cマウス、B6C3F1マウス、あるいはSDラット計32匹から得られたハイブリドーマを約16548ウエルスクリーニングし、1(18)で得られた可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体、KDR各種誘導体に特異的に反応し、かつ1(20)で得られた対照抗原あるいはKM871に反応しない計74クローンの抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体を取得し、それぞれ表1のように命名した。これらの抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の中で、40個のモノクローナル抗体 (KM1668、1768、1825、1826、1827、1828、1829、1831、1835、1837、1853、1856、1857、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1933、1942、1943、1944、1945、1946、1947、1948、1949、1950、1987、1988、1989、1858、1832、183

3、1834、1836、1838、1932) が15.で示す免疫細胞染色法により細胞表面上のKDRに反応することが示された。しかし、血管内皮細胞のVEGF刺激による増殖促進活性を阻害する活性を示すようなKDRの生物活性を阻害するモノクローナル抗体は取得できなかった。

【0232】7. モノクローナル抗体のエピトープ解析6.で述べた抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の特異性をハイブリドーマ培養上清を用いて3.に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

【0233】代表的な結果を 図18に、まとめた結果を図19に示す。上記74種のモノクローナル抗体のうち、KM1668他32種が1番目のIg様ドメイン (1~104アミノ酸に対応) に反応し、KM1987他3種が1番目のIg様ドメイン (1~104アミノ酸に対応) と2番目のIg様ドメイン (105~194アミノ酸に対応) の間に反応し、KM1855他5種が



2番目のIg様ドメイン(105~194アミノ酸に対応)に反応し、KM1858他2種が3番目のIg様ドメイン(195~294アミノ酸に対応)に反応し、KM1854他3種が4番目のIg様ドメイン(295~393アミノ酸に対応)に反応し、KM1832他14種が5番目のIg様ドメイン(394~518アミノ酸に対応)に反応し、KM1665他2種が6~7番目のIg様ドメイン(519~738アミノ酸に対応)に反応した。従って、1番目のIg様ドメインに対する免疫原性の高いモノクローナル抗体の43%が1番目のIg様ドメインに反応した。(21)で示したようにKDRの1番目のIg様ドメインはVEGFの結合活性に関与しないが、免疫原性が高いため、ELISAスクリーニングでは中和活性を示すモノクローナル抗体の作製が困難であると推定された。

【0234】8. [ $^{125}$ I] VEGF-KDR結合阻害アッセイによる抗体価の測定

免疫原性が高く、中和活性に関係のない1番目のIg様ドメインに対するモノクローナル抗体を排除するため、1(18)で得られたKDR-5 $\Delta$ 1N-Fcをマウスに免疫した。マウス抗血清のヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合阻害活性を以下の手順に従い評価した。

【0235】96ウェル・マルチスクリーン-IPプレート\*

\*ト(96-well MultiScreen-IP Plate; ミリポア社製)にメタノールを100 $\mu$ l/ウェルで分注し、プレート底部のPVP膜を親水化した。水で洗浄後、PBSで4 $\mu$ g/mlの濃度に希釈した可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcを50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)含有PBSを200 $\mu$ l/ウェルに加え、室温30分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、1%BSA-PBS溶液で100、1000、10000倍に希釈した抗血清、1%BSA-PBS溶液で希釈した精製モノクローナル抗体(0.01~25 $\mu$ g/ml)、あるいは、ハイブリドーマの培養上清を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、さらに、4 ng/mlの $^{125}$ I標識ヒトVEGF(アマシャム社製)を50 $\mu$ l/ウェルに加え室温で1.5時間反応させた。

【0236】0.05%Tween-PBSで洗浄後、50 $^{\circ}$ Cにてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0(パッカード社製)を10 $\mu$ l/ウェルに加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した $^{125}$ I標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。ハイブリドーマの培養上清の活性を検討した結果を表2に示した。

【0237】

【表2】

抗原	上清の希釈 マウス#	1/10000	1/1000	1/100
		0	2.5	0
KDR7N-Fc	B#	0.35	0	47.7
	C#	16.1	6.7	58
	D#	7.8	10.5	56.1
KDR5N	A#	9.7	3.4	16.5
	C#	14.1	0	1.1
	S#	1	0	19.2
KDR5N-Fc	B#	6.7	14.7	61.4
	A#	7.2	6	63.7
KDR5 $\Delta$ 1N-Fc	1#	11.7	16.2	65.6
	2#	11.6	16.8	49.9
	3#	7.9	24.3	70.3
KDR2N-Fc	1#	0	2.6	27.6
	2#	1.4	0.5	38.2

【0238】KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc免疫したマウス3匹の抗血清は全て100倍希釈において50%以上の結合阻害活性を示し、3匹中1匹の抗血清は1000倍希釈において34.3%と最も強い結合阻害活性を示した。KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc免疫マウスそれぞれ3匹、2匹の抗血清は100倍希釈において50%以上の結合阻害活性を示した。従って、結合阻害活性が最も強く、さらに、免疫原性の強い1番目のIg様ドメインを含まないKDR-5 $\Delta$ 1N-Fcが免疫原として適することが示された。

【0239】9. [ $^{125}$ I] VEGF-KDR結合阻害アッセイによるハイブリドーマのスクリーニング

KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc免疫マウス1匹よりハイブリドーマを作製し、得られた約672ウェルの培養上清を用いて8.で示した $^{125}$ I VEGF-KDR結合阻害アッセイでスクリーニングしたところ、培養上清では90.1、66.7、59.0、85.7、86.

8、78.0、91.2%の結合阻害活性を示す7クローンのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得、これらをそれぞれKM1991~1997と命名した(表1)。

【0240】10. モノクローナル抗体KM1991~1997のエピトープ解析

9.で述べた抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の特異性を精製抗体5 $\mu$ g/mlを用いて3に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

【0241】代表的な結果を図20に、まとめた結果を図19に示す。KM1992、KM1995に代表される上記7種のモノクローナル抗体は全て4番目のIg様ドメイン(295~393アミノ酸に対応)に反応した。従って、KDRのN末から4番目のIg様ドメイン(295~393アミノ酸に対応)がVEGFとの結合に特に重要であることが示された。特に、KM1991、KM1992、KM1993、KM1994およびKM1995は、13.に示

したVEGF受容体KDRの自己リン酸化阻害活性、あるいは、14.に示したVEGF依存的血管内皮細胞の増殖阻害性を示し、KDRの生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体であることが示された。6.で取得された計74クローンの抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体では、KDRの生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体を取得することができなかったのに対し、9.では中和モノクローナル抗体が取得できたことから、免疫原性の強い1番目のIg様ドメインを含まないKDR-5△1N-Fcが免疫原とし\*

\*て適すること、 $[^{125}\text{I}]$ VEGF-KDR結合阻害アッセイがハイブリドマスクリーニング系として適することが明らかとなった。

【0242】モノクローナル抗体の抗体クラスを決めるためにサブクラスタイピングキット [サイメット (Zymed) 社製] を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果を以下の表3に示す。

【0243】

【表3】

抗体クラス	KM番号
IgG1	1665, 1666, 1668, 1768, 1778-1780, 1825-1829, 1831, 1838, 1853-1858, 1862, 1863, 1865, 1943-1950, 1965, 1967, 1968, 1971-1975, 1987-1989, 1992, 1994
IgG2a	1830, 1859-1861, 1864, 1966, 1969, 1970
IgG2b	1993, 1995
IgG3	
IgM	1659, 1942
IgA	1664
IgE	1991, 1996, 1997

【0244】本発明で確立したモノクローナル抗体はIgMであるKM1659、KM1942、IgAであるKM1664、IgEであるKM1991、KM1996、KM1997を除き、すべてIgGクラスであった。

【0245】11. モノクローナル抗体の精製

ブリストン処理した8週令ヌード雌マウス (Balb/c) に6、9で得られたハイブリドマ株を5～10×10<sup>6</sup>細胞/匹それぞれ腹腔内に注射した。10～21日後に、ハイブリドマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8ml/匹) し、遠心分離 (3,000rpm、20分間) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

【0246】12. 抗KDRモノクローナル抗体によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合阻害活性の確認

9.で述べた抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体のヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合阻害活性を8.に示した手順に従い確認した。対照として、抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体のヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を以下の手順に従い確認した。

【0247】96ウェル・マルチスクリーン-IPプレート (96-well MultiScreen-IP Plate; ミリポア社製) にメタノールを100  $\mu$ l/ウェルで分注し、プレート底部のPVDF膜を親水化した。水で洗浄後、PBSで1.6  $\mu$ g/mlの濃度に希釈した可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを50  $\mu$ l/

ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン (BSA) 含有PBSを50  $\mu$ l/ウェル加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、ハイブリドマの培養上清あるいは0.5M NaClを含む1%BSA-PBS溶液で希釈した精製モノクローナル抗体 (0.01～7.29  $\mu$ g/ml) を50  $\mu$ l/ウェルで分注し、さらに、3ng/mlの $^{125}\text{I}$ 標識ヒトVEGF (アマシャム社製) を50  $\mu$ l/ウェル加え室温で1.5時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (バックカード社製) を30  $\mu$ l/ウェル加え、トップカウント (バックカード社製) を用いて、各ウェルに結合した $^{125}\text{I}$ 標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。

【0248】結果を図20に示す。KM1992、1993、1994、1995は濃度依存的にヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合を阻害した。ヒトVEGFとヒトVEGF受容体KDRの結合の50%阻害を示すKM1992、1993、1994、1995の濃度 (IC<sub>50</sub>) はそれぞれ2.26、2.43、0.74、1.95  $\mu$ g/mlであった。一方、コントロールとして使用したマウスIgG1クラスである抗シアリルルイスAモノクローナル抗体KM231 [アンチキャンサー・リサーチ (Anticancer Research), 10, 1579 (1990)] は全く阻害活性を示さなかった。さらに、コントロール実験系として用いたヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合をKM1992、1993、1994、1995は全く阻害せず、KM1992、1993、1994、1995はKDR特異的

な結合阻害剤であることが示された。

### 13. 抗KDRモノクローナル抗体によるVEGF受容体KDRの自己リン酸化阻害

9. で述べた抗ヒトVEGF受容体KDR モノクローナル抗体によるヒトVEGFの生物活性の阻害を以下の手順により確認した。

【0249】ヒトVEGF受容体KDR発現NIH3T3細胞(NIH3T3-KDR)を10%FCS-DMEM培地20mlを用いて175cm<sup>2</sup>フラスコにて5~10×10<sup>6</sup>cells/フラスコになるまで培養した。培養後、0.1 mMのオルトバナジン酸(V)ナトリウムを含む0.1%FCS-DMEM10mlに交換し、抗VEGF受容体KDR抗体を10μg/mlとなるように添加して氷上で30分間前処理を行った。前処理後、ヒトVEGF(R&D社製)を50 ng/mlとなるように添加し、氷上で45分間刺激を行った。刺激後、フラスコから培地を除去し、細胞破碎緩衝液[20 mM Heps (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.2% TritonX-100, 10% Glycerol, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, 5μg/ml leupeptin]を2ml加え、細胞を破碎し、細胞破碎液を得た。細胞破碎液を15,000×gで10分間遠心分離を行い、上清にヤギ抗マウスIgG(H+L)セファロース4B(Zymed Laboratories社製)を100μl添加し4℃で1時間穏やかに混合した。5,000×gで1分間遠心分離後、上清にヤギ抗マウスIgG(H+L)セファロース4Bを30μl、マウス抗KDRモノクローナル抗体KM1668を10μg添加し、4℃で1晩穏やかに混合し、免疫沈降を行った。5,000×gで1分間遠心分離を行い、セファロースを回収し、回収したセファロースを1mlの細胞破碎緩衝液で洗浄した。洗浄操作は繰り返して6回行った。洗浄後、回収したセファロースから30μlの2-メルカプトエタノールを含むSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルバッファー(2倍濃度)にて吸着タンパク質を溶出し、全量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウェスタンブロッティングに供した。ブロッティング後のPVDF膜は1%BSA-PBSに室温で30分間反応させブロッティング操作を行い、ウサギ抗リン酸化チロシン抗体(2μg/ml)(Upstate Biotechnology Incorporated社製)を4℃にて1晩反応させた。0.05% Tween-PBSで洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したブタ抗ウサギIgG(1000倍希釈:Dako社製)を室温で1時間反応させた。0.05% Tween-PBSで洗浄し、ECL<sup>TM</sup>Western blotting detection reagents(アマシャム社製)を用いて、ウサギ抗リン酸化チロシン抗体が結合したバンドを検出した。

【0250】結果を図22に示す。VEGF添加によりVEGF受容体KDRの自己リン酸化が検出されたが、マウス抗KDRモノクローナル抗体KM1991, 1992, 1994, 1995添加によりKDRの自己リン酸化が抑制された。

【0251】14. 抗KDRモノクローナル抗体によるVEGF依存的血管内皮細胞の増殖阻害

9. で述べた抗ヒトVEGF受容体KDR モノクローナル抗体

によるヒトVEGFの生物活性の阻害を以下の手順により確認した。48ウェルマイクロタイタープレートにE-BM培地に5%ウシ胎児血清(FBS)、ヒト組み換え型上皮成長因子(hEGF)10ng/ml、ヒドロコルチゾン1μg/ml、ゲンタマイシン50μg/ml、アンファテリシンB 50ng/mlを添加した培地(クラボウ社製)に浮遊させたヒト皮膚由来微小血管内皮細胞HMVEC(クラボウ社製)を4000個/800μl/ウェルになるように加えた。次に、上記培地で希釈した精製抗VEGF受容体KDRモノクローナル抗体(終濃度2μg/mlおよび20μg/ml)100μl/ウェルで添加し、さらに、上記培地で希釈したヒトVEGF(R&D社製)を100μl/ウェル(終濃度1ng/ml)で添加し、37℃CO<sub>2</sub>インキュベーター中で5日間培養した。培養後、培養上清を除去し、200μlの10%FCS添加のフェノールレッド除去RPMI1640(ニッスイ社製)を各ウェルに加え、さらに、20μlの細胞発色用試薬(Cell Counting Kit; 同仁化学社製)を加え、37℃で1~2時間培養した。培養終了後、150μlをEIA用96ウェルマイクロタイタープレートに移し、OD450nmの吸光度を測定した。1ng/mlのVEGF添加時のHMVECの増殖を100%、VEGF非添加時のHMVECの増殖を0%とした相対的な細胞増殖活性を示した。

【0252】結果を図23に示す。抗VEGF受容体KDRモノクローナル抗体KM1992およびKM1995は濃度依存的にVEGF依存的なHMVECの増殖を阻害した。2μg/ml添加時のKM1992およびKM1995の増殖阻害活性は、それぞれ74.3%、70.9%、20μg/ml添加時のKM1992およびKM1995の増殖阻害活性は、それぞれ108.7%、103.0%であった。一方、コントロールとして使用したKM231および抗体非添加群は阻害活性を示さなかった。

【0253】15. モノクローナル抗体のヒトVEGF受容体KDR発現細胞との反応性の確認6および9で述べた抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の特異性を免疫細胞染色を用いて以下の手順に従い確認した。

【0254】ヒトVEGF受容体KDR発現NIH3T3細胞(NIH3T3-KDR)、コントロールNIH3T3細胞(NIH3T3-Neo)、ヒト皮膚由来微小血管内皮細胞HMVEC(クラボウ社製)、ヒトさい帯静脈由来血管内皮細胞HUVEC(クラボウ社製)2~5×10<sup>5</sup>個を丸底96ウェルプレートに免疫細胞染色用緩衝液(1%BSA、0.02%EDTA、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS)100μlに懸濁して分注した。4℃、350×gで1分間遠心分離後、上清を除き、6、9で述べた精製抗体(10μg/ml)50μlを加えて4℃で30分間反応させた。反応後、200μlの免疫細胞染色用緩衝液を各ウェルに加え4℃、350×gで1分間遠心分離後、上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに2回行った後、FITC標識抗マウスIgMノグロブリン抗体あるいはFITC標識抗ラットIgMノグロブリン抗体(和光純薬社製)を1μg/mlの濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液50μlを加えて4℃で30分間反応させた。反応後、上記と同

様の洗浄操作を3回行った後フローサイトメーター（コーンター社製）を用いて解析を行った。

【0255】結果を図24に示す。抗ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体KM1668はコントロール細胞には反応せずKDR発現細胞に特異的に顕著に反応した（A）。また、ヒト血管内皮細胞HMVECおよびHUVECに反応し、血管内皮細胞上のKDRを検出可能性あることが示された。

【0256】また、9.で示した $[^{125}\text{I}]$ VEGF-KDR結合阻害アッセイにより選択されたKM1992、KM1993、KM1994、KM1995は、ヒト血管内皮細胞HMVECおよびHUVECに反応し、血管内皮細胞上のKDRを検出可能性あることが示された（図25）。

# \*【0257】

【発明の効果】本発明により、ヒト血管新生部の血管内皮細胞上に特異的に発現されているヒトVEGF受容体KDRに特異的に結合する抗体が提供される。本発明の抗体は免疫細胞染色におけるヒト血管新生部の免疫学的検出、KDRの作用の中和による固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用である。

# 【0258】

## 【配列表】

\*

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Anti human VEGF receptor KDR antibody ,comprising novel amino acid sequences of complementary determinant regions

<130> H11-112

<160> 56

<170> PatentIn Ver. 2.0

# 【0259】<210> 1

<211> 431

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<400> 1

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt	48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-15 -10 -5	
gtc cat tgc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag gtg gtg aag	96
Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys	
-1 1 5 10	
cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
act gac tat act ata cac tgg atg aaa cag agt cct gga cag gga ctt	192
Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga tgg att tat cct gga agt ggt aat act tac tac aat	240
Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn	
50 55 60	
gac aaa ttc aag ggc aag gcc aca atg act gca gac aaa tcc tcc agc	288
Asp Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg acc tct gag gat tct gcg gtc	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gca aga cgg agc tta gtt tgg tac tac gat ggt agt tcc	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Ser Leu Val Trp Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser	

73

74

95

100

105

tgg ttt cct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca g 432

Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

120

【0260】

\* \* 【0261】 &lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 394

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 2

atg gag aca gac aca ctc ctg tta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

-20

-15

-10

-5

ggg tcc act ggt gac att gtg ctg aca cag tct cct gct tcc tta gct 96

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

-1 1

5

10

gta tct ctg ggg cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc agc aaa agt 144

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser

15

20

25

gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg tac caa cag aaa cca 192

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

30

35

40

gga cag cca ccc aaa ttc ctc atc tat ctt gca tcc aac cta gaa tct 240

Gly Gln Pro Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

45

50

55

60

ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc 288

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

65

70

75

ctc aat atc cat cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt 336

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

80

85

90

cag cac agt agg gag ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

95

100

105

gag ctg aaa c 39

4

Glu Leu Lys

110 111

【0262】

※ ※ 【0263】 &lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 412

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg gga tgg agc tgt atc acc ctc ttt ttg gta gca gca gct aca ggt 4

8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Thr Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly



75

76

-15                      -10                      -5  
 gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag      9  
 6  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys  
          -1 1                      5                      10  
 cct ggg gcc tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc      14  
 4  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
          15                      20                      25  
 acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt      19  
 2  
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 30                      35                      40                      45  
 gaa tgg att ggt aat att gac cct tct gat agt gaa att ttc tac aat      24  
 0  
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Ile Phe Tyr Asn  
          50                      55                      60  
 caa aaa ttc agg gac aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc      28  
 8  
 Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
          65                      70                      75  
 aca gcc tac atg cag ctg agt agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc      33  
 6  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
          80                      85                      90  
 tat tac tgt atg gta ccc tat tat tat gct atg gac tac tgg ggt caa      38  
 4  
 Tyr Tyr Cys Met Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
          95                      100                      105  
 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc a      41  
 2  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala  
 110                      115                      118

【0264】

\* \* 【0265】 &lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca      48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
          -20                      -15                      -10  
 gtc ata ctg tcc aga gga caa att gtt ctg acc cag tct cca gca atc      96  
 Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
          -5                      -1 1                      5                      10  
 atg tct gca tct cca ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc      144  
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
          15                      20                      25  
 tca agt ata agt tac ata cac tgg tac caa cag aag cca ggc acc tcc      192

77 78  
 Ser Ser Ile Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser  
           30                  35                  40  
 ccc aaa aga tgg att tat gac aca tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct 240  
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
           45                  50                  55  
 gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc 288  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
           60                  65                  70  
 agc agc atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cat cag cgg 336  
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg  
           75                  80                  85                  90  
 agt agt tac ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 384  
 Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   95                  100                  105 106  
 c 385

【0266】

\* \* 【0267】 &lt;210&gt; 5

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 5  
 Asp Tyr Thr Ile His

【0268】

※ ※ 【0269】 &lt;210&gt; 6

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 6  
 Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Asp Lys Phe Lys Gly

【0270】

★ ★ 【0271】 &lt;210&gt; 7

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 7  
 Arg Ser Leu Val Trp Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser Trp Phe Pro Tyr

【0272】

☆ ☆ 【0273】 &lt;210&gt; 8

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 8  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His

79

80

1

5

10

15

【0274】

\* \* 【0275】 &lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

7

【0276】

※ ※ 【0277】 &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr

1

5

9

【0278】

★ ★ 【0279】 &lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

Ser Tyr Trp Met His

1

5

【0280】

☆30☆ 【0281】 &lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 12

Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Ile Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Asp

1

5

10

15

17

【0282】

◆ ◆ 【0283】 &lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

8

【0284】

\* \* 【0285】 &lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

81

82

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 14

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Ile His

1

5

10

【0286】

\* \* 【0287】 &lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 15

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

7

【0288】

※ ※ 【0289】 &lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5

9

【0290】

★ ★ 【0291】 &lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 17

gcagcctcca ccaagggcc

19

【0292】

☆ ☆ 【0293】 &lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 18

cttggtggag g

11

【0294】

◆ ◆ 【0295】 &lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 19

gtggaggagg aggatgctgc aacctattac tgcagcaca gtagggagct tccgctcacg 60

83

84

91

ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa c

【0296】

\* \* 【0297】 &lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 20

gtacgtttca gctccagctt ggtcccagca ccgaacgtga gcggaagctc cctactgtgc 60

tgacagtaat aggttgacgc atcctcctcc tccacagg

98

【0298】

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 21

tcagcctcca ccaagggcc

19

【0299】

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 22

aattccacca tggattttca ggtgcagatt ttcagcttcc tgc

43

【0300】

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 23

aggaagctga aaatctgcac ctgaaaatcc atggtgg

37

【0301】

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 24

cgtggacgtt cggaggagcc accaagctgg aaatcaaac

39

【0302】

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA



85

86

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 25

gtacgtttga ttccagctt ggtgcctcca ccgaacgtc

39

[0303]

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt;

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-15 -10 -5

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn

50 55 60

Asp Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Ser Leu Val Trp Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser

95 100 105

Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115 120

[0304]

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 27

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

-20 -15 -10 -5

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

-1 1 5 10

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser

15 20 25

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

30 35 40

Gly Gln Pro Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

45 50 55 60

87 88  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
                     65                    70                    75  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                     80                    85                    90  
 Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
                     95                    100                    105  
 Glu Leu Lys  
                     110 111

【0305】

<210> 28  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 28  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Thr Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys  
                     -1 1                    5                    10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                     15                    20                    25  
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
                     30                    35                    40                    45  
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Ile Phe Tyr Asn  
                     50                    55                    60  
 Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
                     65                    70                    75  
  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                     80                    85                    90  
 Tyr Tyr Cys Met Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     95                    100                    105  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala  
                     110                    115                    118

【0306】

<210> 29  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <223>  
 <400> 29  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
                     -20                    -15                    -10  
 Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
                     -5                    -1 1                    5                    10  
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
                     15                    20                    25

89 90  
 Ser Ser Ile Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser  
 30 35 40  
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg  
 75 80 85 90  
 Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

## 【0307】

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DNA  
 <400> 30  
 ctctagag

8

## 【0308】

<210> 31  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DNA  
 <400> 31  
 cagtgttctt ggctgtgcaa aaagtgagg catttttcat aatagaaggt gcctacgtag 60

## 【0309】

<210> 32  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DNA  
 <400> 32  
 gatcctacgt aggcaccttc tattatgaaa aatgcctcca cttttgcaca gccagaaca 60  
 ctgcatg 67

## 【0310】

<210> 33  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DNA  
 <400> 33  
 gatcatggag cttaagaatg catccttgca gg

32

91

92

## 【0311】

<210> 34  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 34  
acgctctagg actgttacgt acctgaccac gcaatg

36

## 【0312】

<210> 35  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 35  
aacaaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

## 【0313】

<210> 36  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 36  
ggccgctcat tatacgtacc cgactttgtt

30

## 【0314】

<210> 37  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 37  
ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattg

28

## 【0315】

<210> 38  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
  
<400> 38  
atacacaacc agggtacca catggctctg ct

32

## 【0316】

<210> 39  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 39  
caaggattgt acacctgtgc agcatccagt gggtgtacg tagc 44

## 【0317】

<210> 40  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 40  
ggccgctacg tacagcccac tggatgctgc acaggtgtac aatc 44

## 【0318】

<210> 41  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 41  
taatgatgaa agttaccagt ctattatgta cgtacg 36

## 【0319】

<210> 42  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 42  
ggccgctacg tacataatag actggtaact ttcacat 38

## 【0320】

<210> 43  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 43  
gatcttacgt agc 13



95

96

## 【0321】

<210> 44  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 44  
ggccgctacg taa

13

## 【0322】

<210> 45  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 45  
atcccggtta cttctagag tcgaggt

27

## 【0323】

<210> 46  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 46  
tgtcccctgc aagtagatct aagagttgta

30

## 【0324】

<210> 47  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 47  
gtataatgag cggccgcg

18

## 【0325】

<210> 48  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 48  
gatccgcggc cgctcattat ac

22

97

98

## 【0326】

<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 49  
ctaatagagcg gccgcgcatg

20

## 【0327】

<210> 50  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 50  
cgcgccgct cattag

16

## 【0328】

<210> 51  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 51  
aacaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

## 【0329】

<210> 52  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 52  
ggccgctcat tatacgtacc cgactttgtt

30

## 【0330】

<210> 53  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic DNA  
<400> 53  
ctaatagagc

9

【0331】

<210> 54  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DNA  
 <400> 54  
 ggccgctcat taggtac

17

【0332】

<210> 55  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 55  
 Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile  
 20 25 30  
 Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu  
 50 55 60  
 Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr  
 85 90 95  
 Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp  
 100 105 110  
 Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val  
 115 120 125  
 Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala  
 130 135 140  
 Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala  
 165 170 175  
 Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser  
 180 185 190  
 Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val  
 195 200 205  
 Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val  
 210 215 220  
 Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 245 250 255  
 Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr

101	260	265	270
Leu Thr Ile Asp Gly Ile Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys			
275	280	285	
Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg			
290	295	300	
Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu			
305	310	315	320
Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu			
325	330	335	
Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu			
340	345	350	
Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu			
355	360	365	
Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro			
370	375	380	
Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val			
385	390	395	400
Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr			
405	410	415	
Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro			
420	425	430	
Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala			
435	440	445	
Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu			
450	455	460	
Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val			
465	470	475	480
Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser			
485	490	495	
Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu			
500	505	510	
Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val			
515	520	525	
Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu			
530	535	540	
Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu			
545	550	555	560
Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val			
565	570	575	
Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys			
580	585	590	
Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met			
595	600	605	
Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu			
610	615	620	
Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu			
625	630	635	640
Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn			
645	650	655	

103 104  
 Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser  
                   660                  665                  670  
 Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu  
                   675                  680                  685  
 Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr  
                   690                  695                  700  
  
 Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala  
 705                  710                  715                  720  
 Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu  
                   725                  730                  735  
  
 Gly Ala  
                   738

## 【0333】

<210> 56  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 56  
 Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
                   1                  5                  10                  15  
 Thr Arg Ala  
                   19

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpBS1992Holoigoの造成工程を示した図である。

【図2】 プラスミドpBS1992Loligoの造成工程を示した図である。

【図3】 プラスミドpKANTEX1992Hの造成工程を示した図である。

【図4】 プラスミドpKANTEX1992の造成工程を示した図である。

【図5】 プラスミドpBS1995Holoigoの造成工程を示した図である。

【図6】 プラスミドpBS1995Loligo1の造成工程を示した図である。

【図7】 プラスミドpBS1995Loligo2の造成工程を示した図である。

【図8】 プラスミドpKANTEX1995Hの造成工程を示した図である。

【図9】 プラスミドpKANTEX1995の造成工程を示した図である。

【図10】 抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992およびKM2995の可溶性ヒトVEGF受容体との結合活性を示した図である。(A)は、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992を、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nあるいは可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを2 $\mu$ g/mlの濃度で吸着させたウェルに対して反応させた場合の結果である。

縦軸は可溶性ヒトVEGF受容体との結合活性、横軸は抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992の濃度をそれぞれ示す。●が可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nとの結合活性、○が可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性を示す。(B)は、抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2995を、可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nあるいは可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを2 $\mu$ g/mlの濃度で吸着させたウェルに対して反応させた場合の結果である。縦軸は可溶性ヒトVEGF受容体との結合活性、横軸は抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2995の濃度をそれぞれ示す。■が可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7Nとの結合活性、□が可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性を示す。

【図11】 抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992およびKM2995の、ヒトVEGFと可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcとの結合に対する阻害活性を示した図である。(A)は抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2992(●)による阻害実験の結果である。(B)は抗ヒトVEGF受容体KDRヒト型キメラ抗体KM2995(■)による阻害実験の結果である。

【図12】 プラスミドpVL-KDR-7N-Fcの造成工程を示した図である。

【図13】 可溶性KDR-Fc各種誘導体の模式図である。

【図14】 可溶性KDR各種誘導体の模式図である。

【図15】 精製した可溶性KDR-Fc各種誘導体のSDSポリアクリルアミド電気泳動(5~20%グラジエントゲル

を使用)のパターンを示した図である。左より、KDR-1N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-7N-Fc、KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fcの泳動パターンをそれぞれ示す。還元条件下で電気泳動を行った。

【図16】 プレートコートした可溶性ヒトVEGF受容体KDR-7N-Fcへの $^{125}$ I-ヒトVEGFの結合に及ぼす可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体の阻害効果を解析した結果を示す。

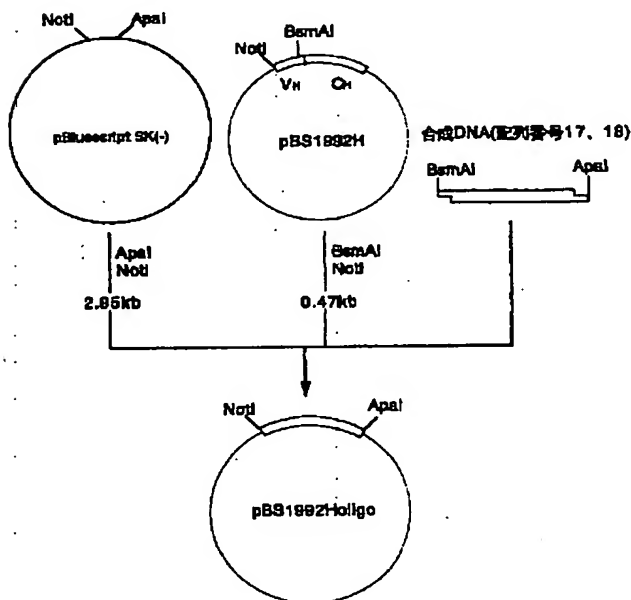
【図17】 プレートコートした可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体への $^{125}$ I-ヒトVEGFの結合を解析した結果を示す。

【図18】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

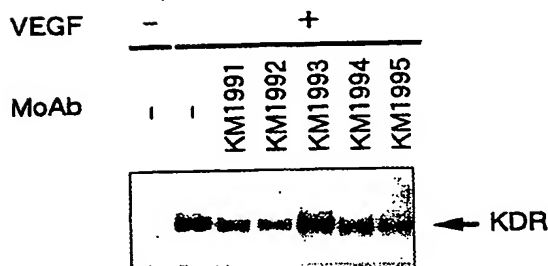
【図19】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体のエピトープ部位を示す。

【図20】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体の

【図1】



【図22】



可溶性ヒトVEGF受容体KDR-Fc各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

【図21】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体によるVEGFと可溶性VEGF受容体KDR-7N-Fcおよび可溶性VEGF受容体Flt-1 7Nの結合阻害効果を解析した結果を示す。

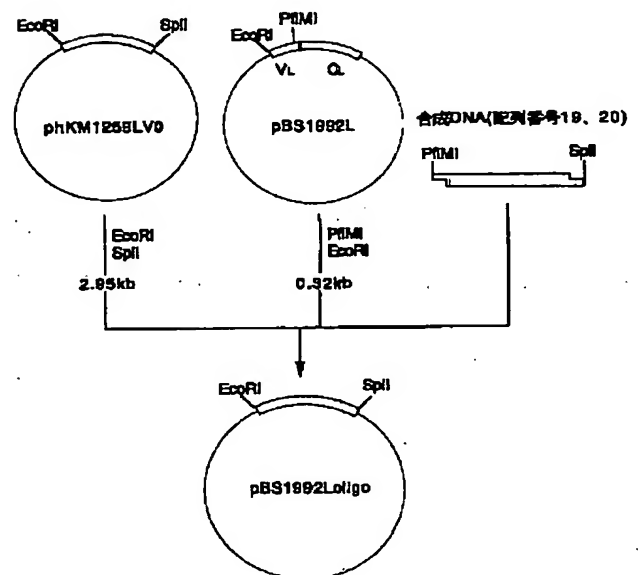
【図22】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体によるKDR自己リン酸化阻害活性を検討した結果を示す。

【図23】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体によるVEGF依存的な血管内皮細胞の増殖阻害活性を検討した結果を示す。

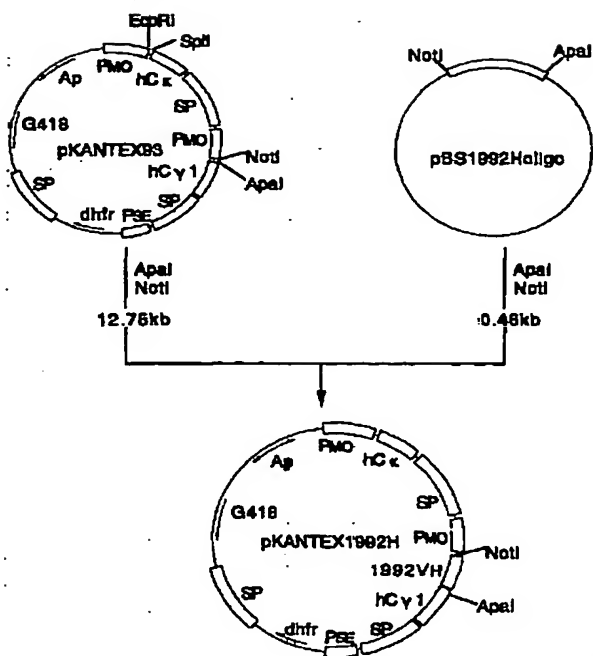
【図24】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体のヒトVEGF受容体KDR発現細胞NIH3T3-Flt-1、コントロール細胞NIH3T3-Neo細胞、HUVECおよびHMVECとの反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

【図25】 ヒトVEGF受容体KDRモノクローナル抗体のHUVECおよびHMVECとの反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

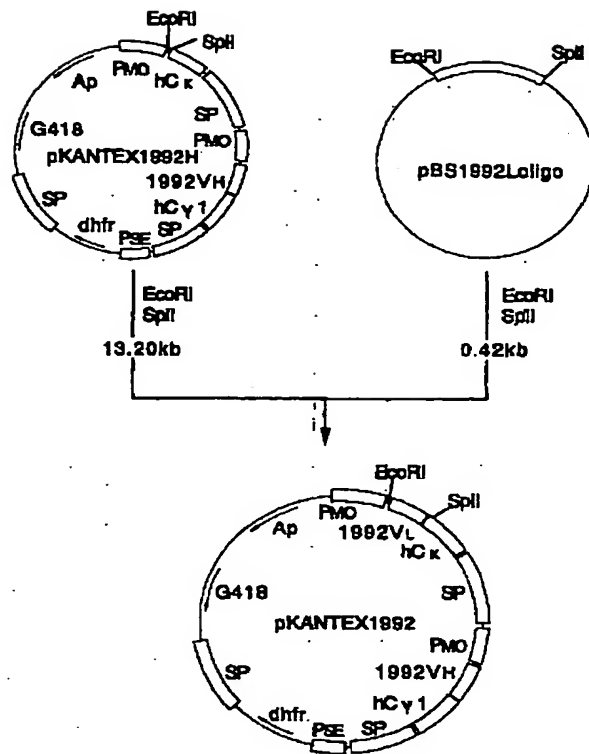
【図2】



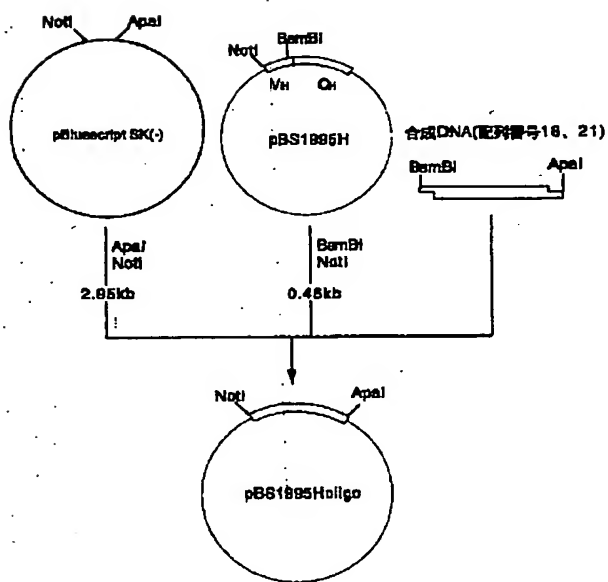
【図3】



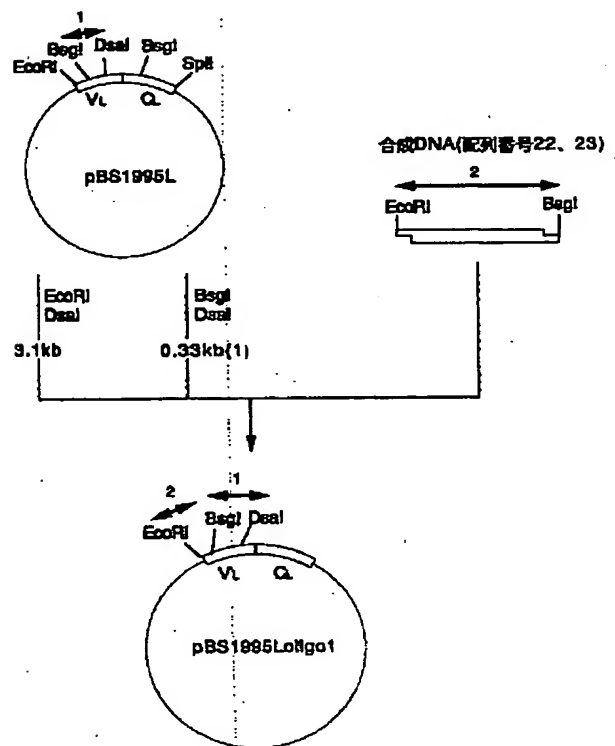
【図4】



【図5】

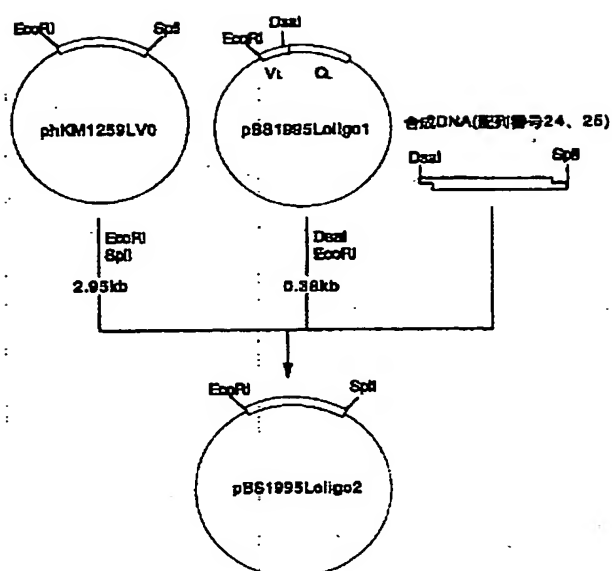


【図6】

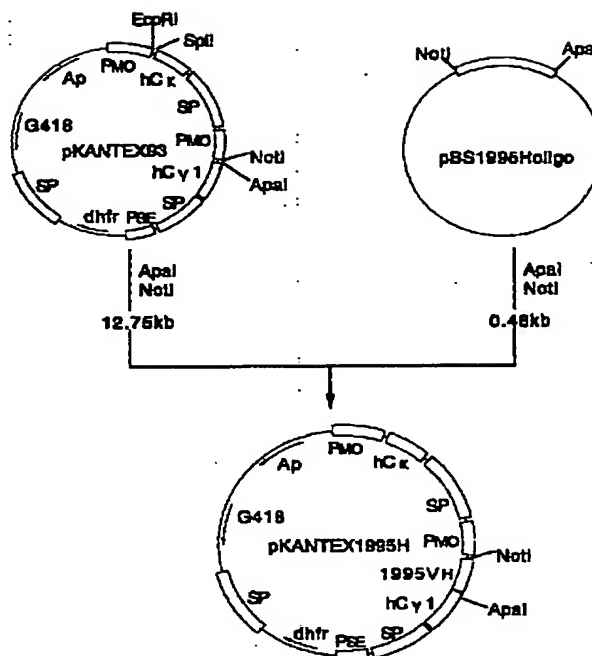




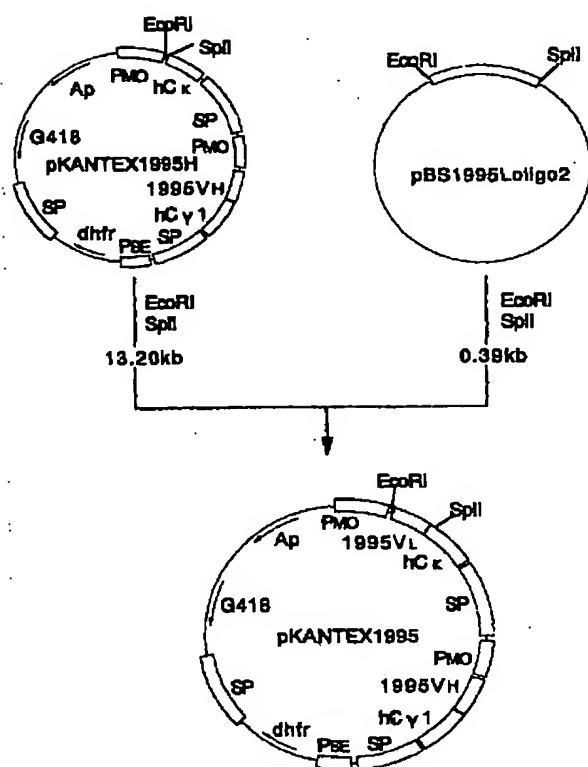
【図7】



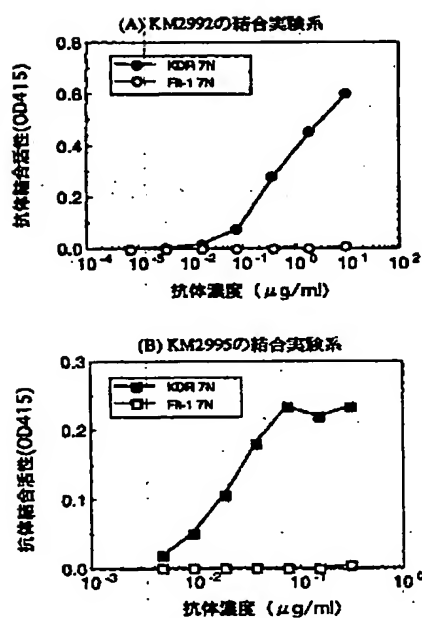
【図8】



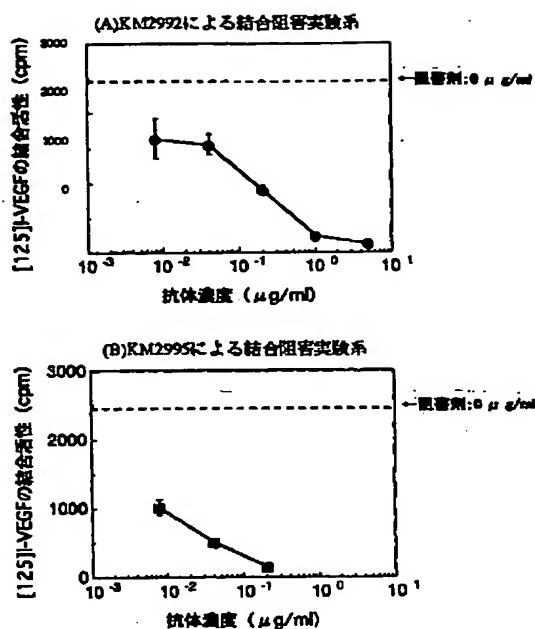
【図9】



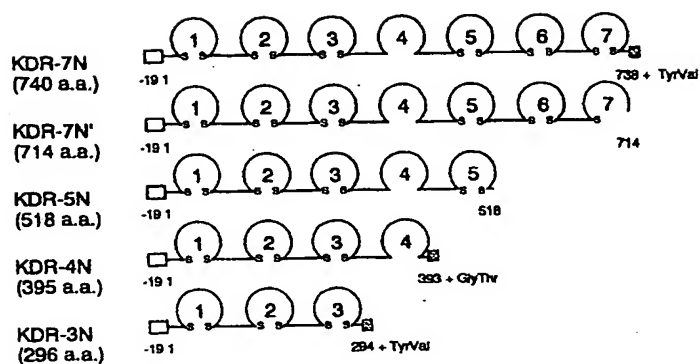
【図10】



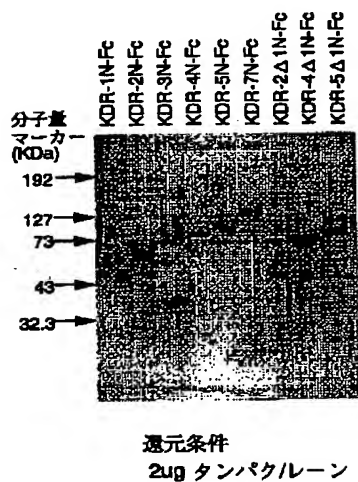
【図11】



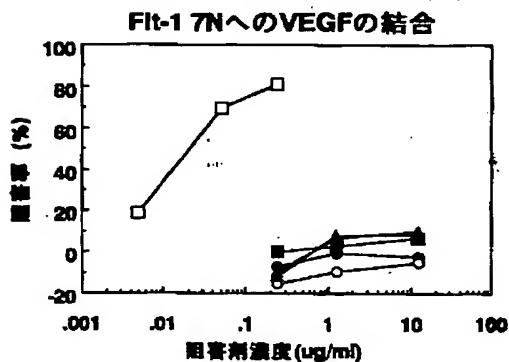
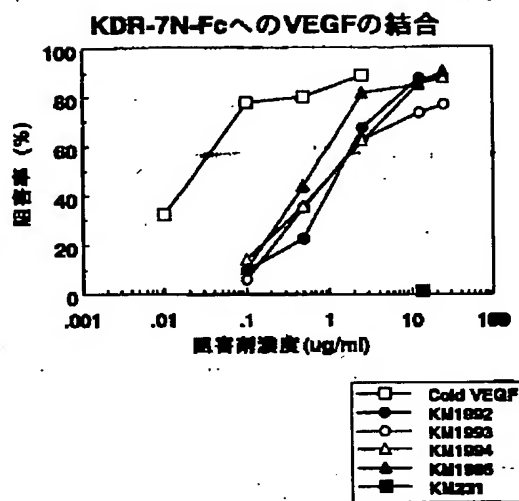
【図14】



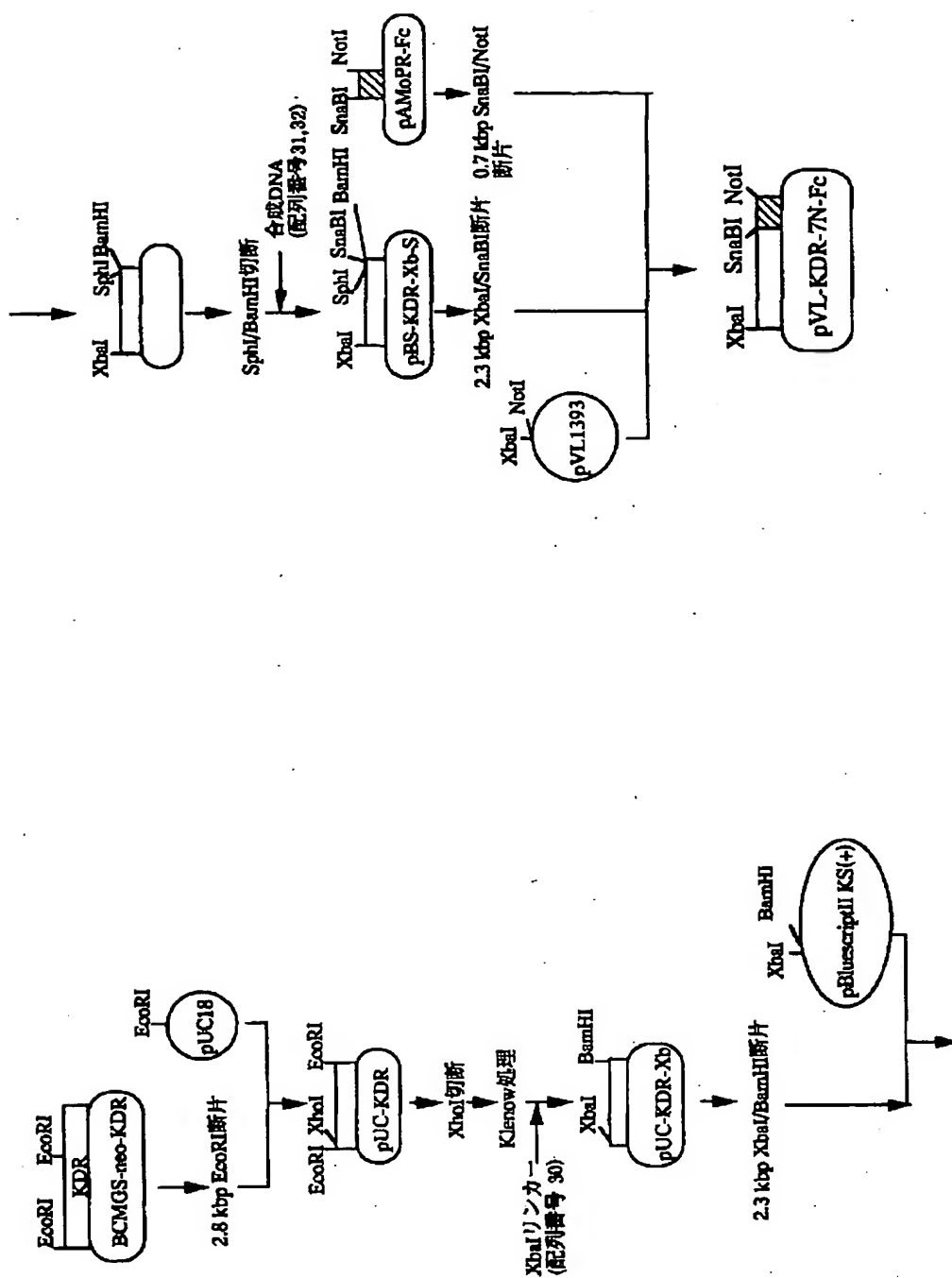
【図15】



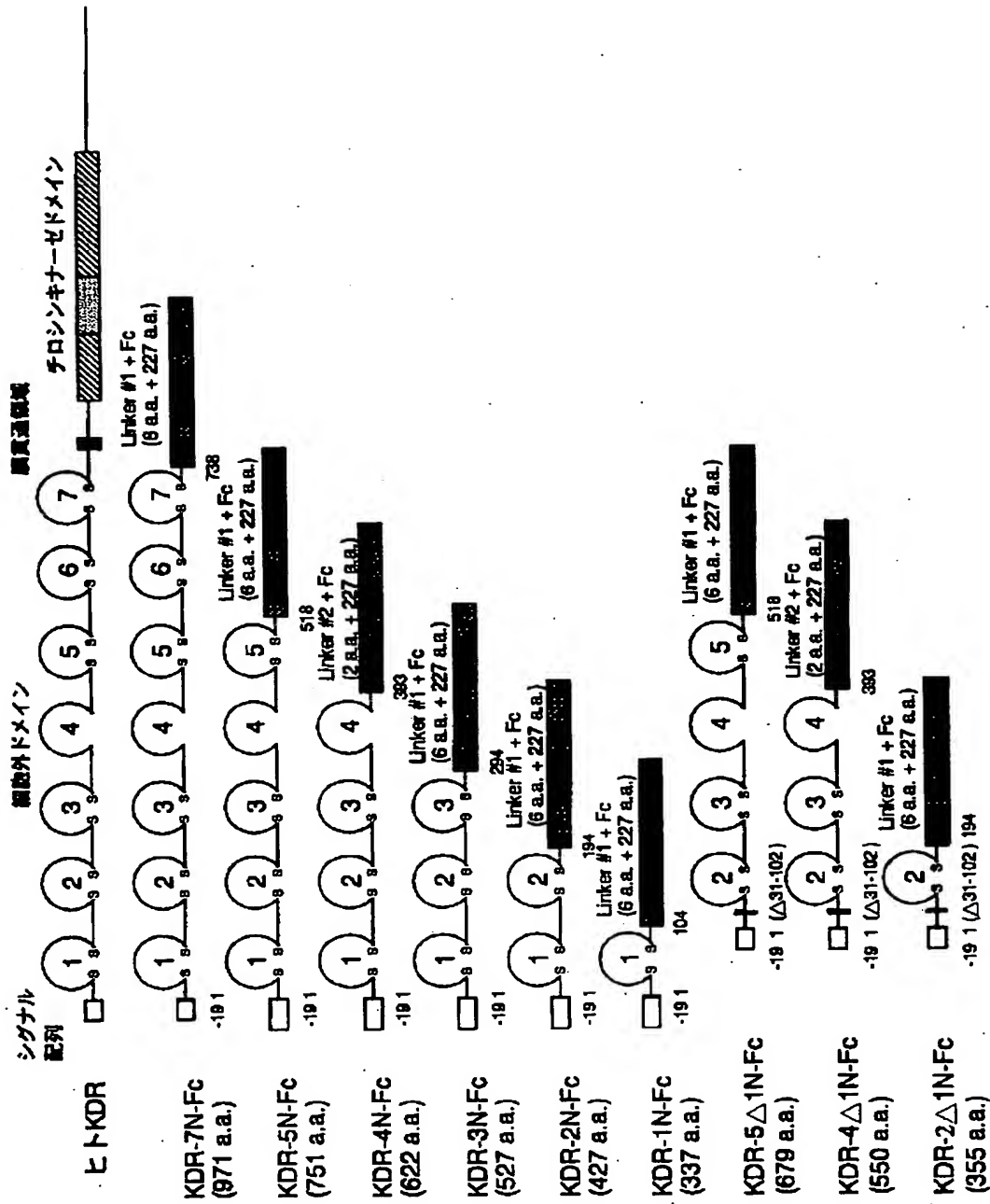
【図21】



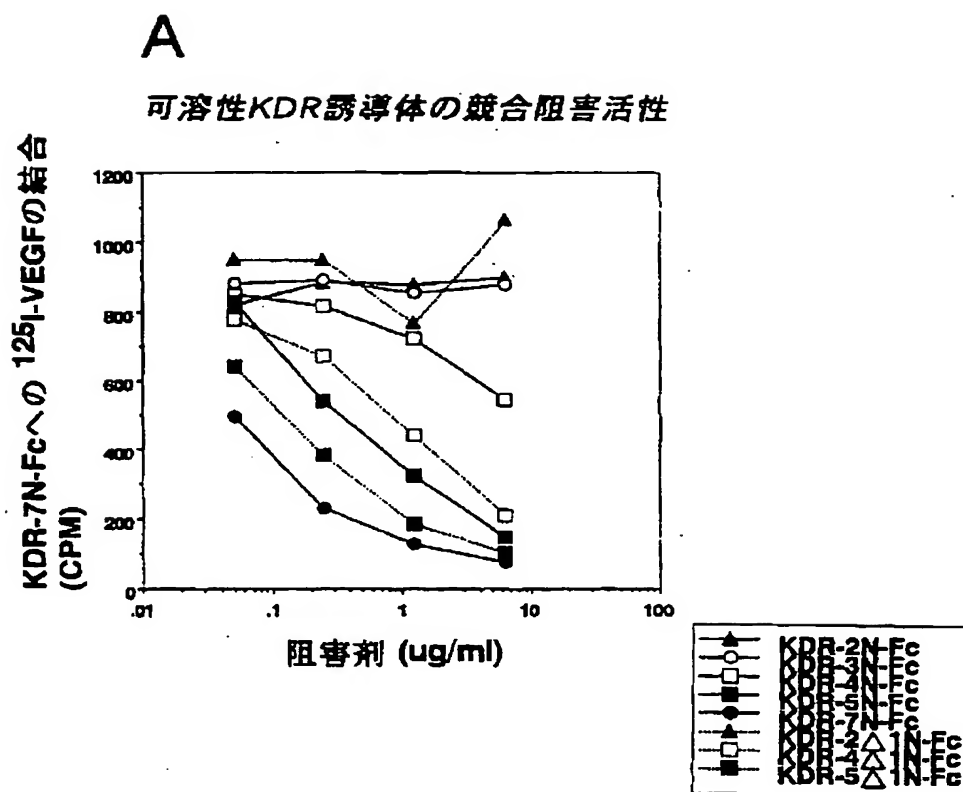
【図12】



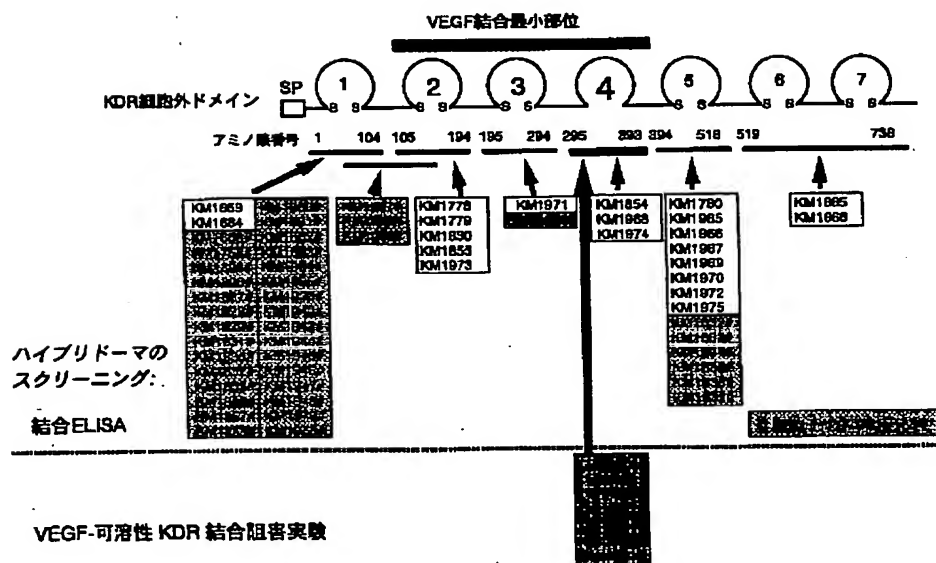
【図13】



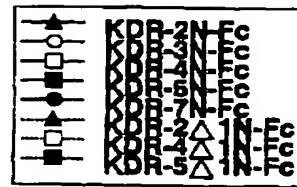
【図16】



【図19】

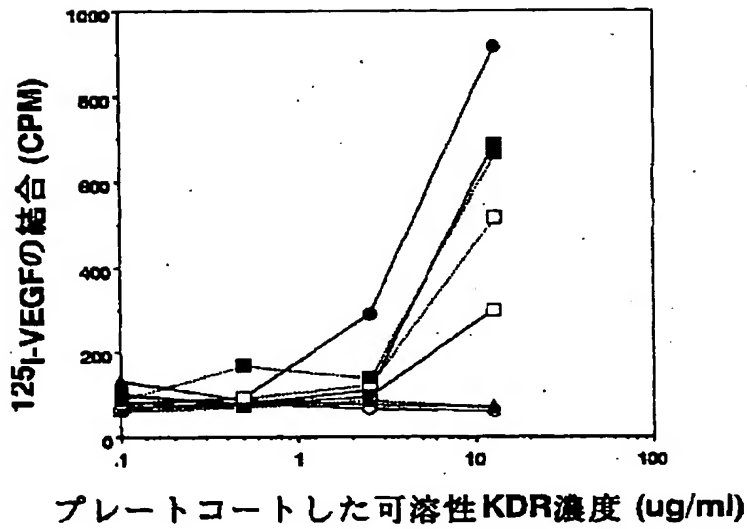


【図17】

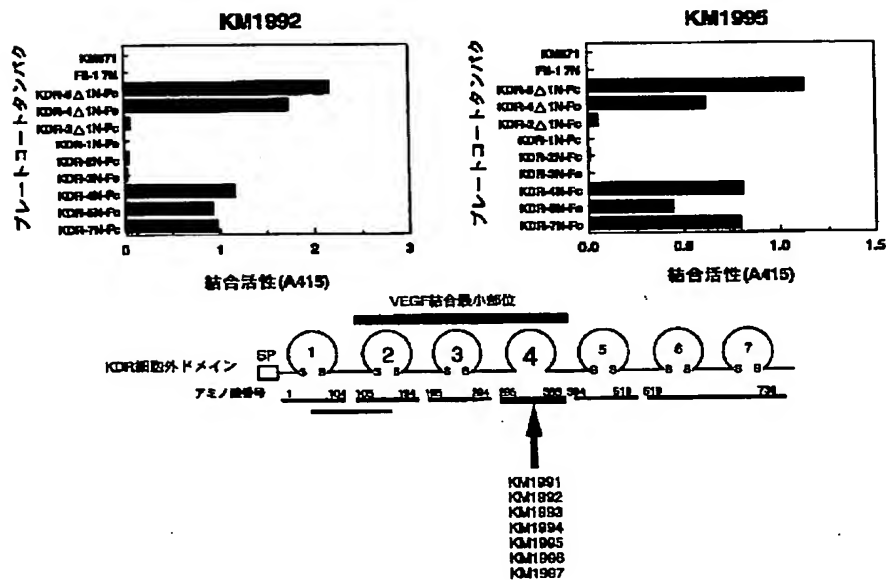


B

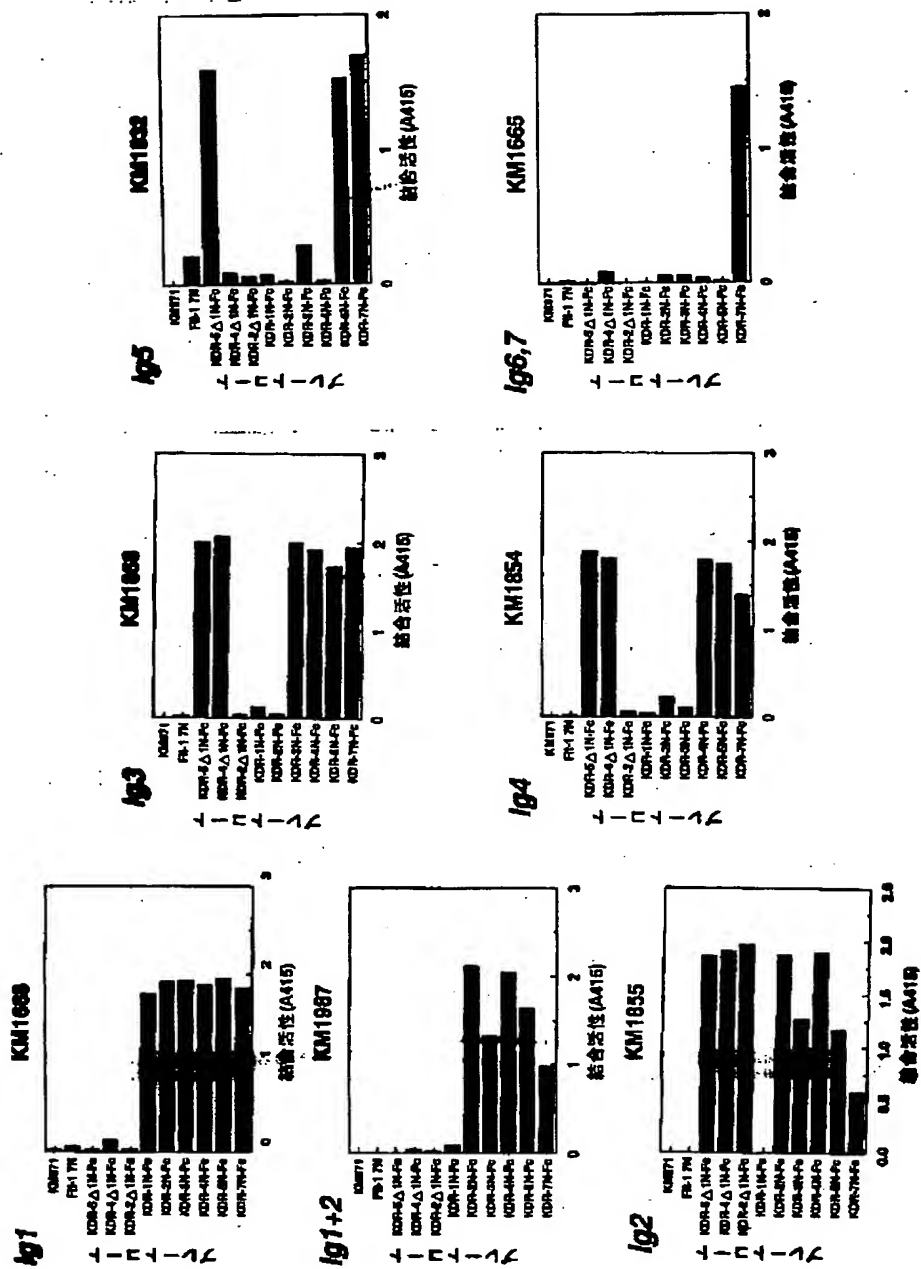
可溶性KDR誘導体のVEGF結合活性



【図20】

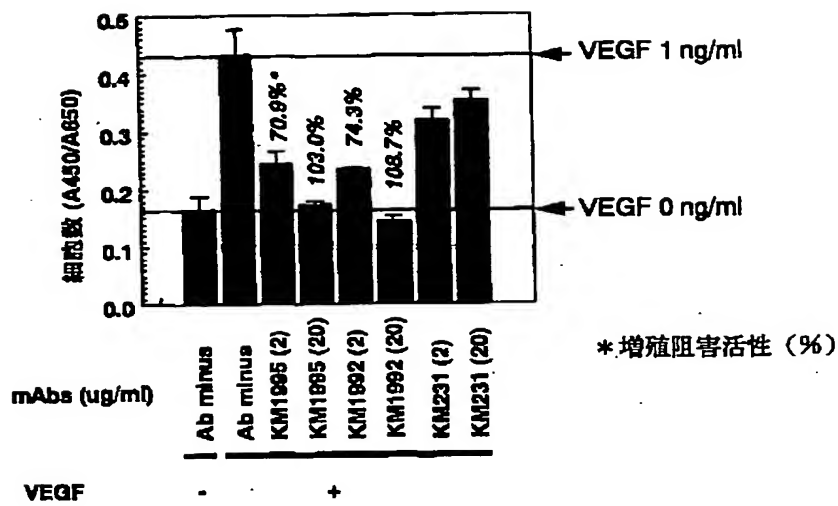


【図18】

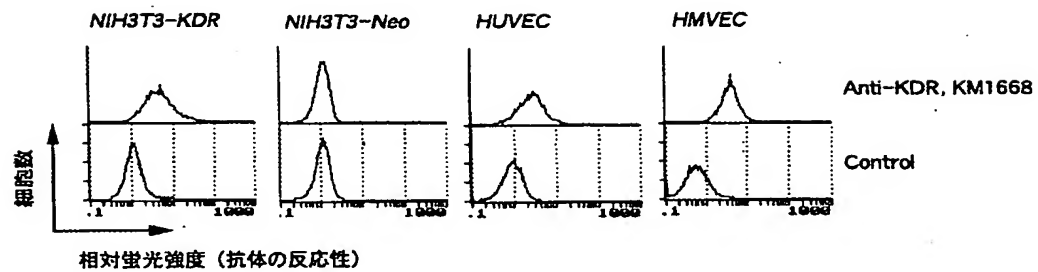




【図23】

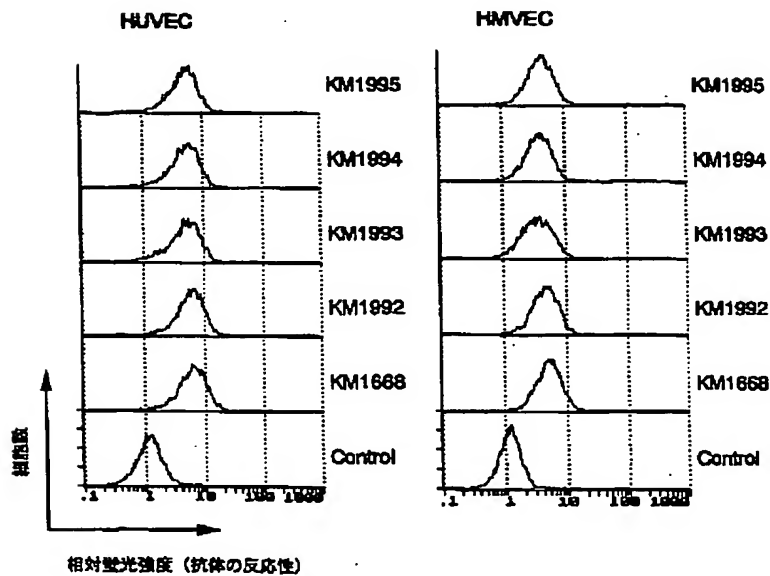


【図24】



HUVEC: ヒト臍静脈血管内皮細胞  
HMVEC: ヒト皮膚毛細血管内皮細胞

【図25】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーム(参考)
A 6 1 P	19/02	A 6 1 P	19/02
	27/02		27/02
	35/00		35/00
	35/04		35/04
C 0 7 K	16/28	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	21/08
C 1 2 P	21/08	G 0 1 N	33/531
G 0 1 N	33/531	C 1 2 N	5/00
			A
			B

(72)発明者 上野 浩尚  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
 酵工業株式会社東京研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA02 CA04 CA07 DA02  
 DA03 DA05 EA04 GA11  
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13  
 4B065 AA90X AA91X AA91Y AA93X  
 AA93Y AB01 AC14 BA02  
 CA25 CA44 CA46  
 4C085 AA13 AA16 AA19 BB11 BB41  
 BB43 BB44 CC02 EE01 GG02  
 GG08 GG10  
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50  
 FA72 FA74